

Ana Filipa Faim Moço

EXPANSÃO *EX VIVO* DE ENDOTÉLIO CORNEANO



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

.....K 2015

Capa:

Marcação de colagénio 1 α 1 (verde) nas culturas primárias de células de endotélio corneano. Imagem obtida por microscopia de fluorescência. Os núcleos estão marcados com DAPI. Ampliação 630x.

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied in the condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgment.

"I've paid my dues,

Time after time

I've done my sentence

But committed no crime

And bad mistakes

I've made a few

I've had my share of sand

Kicked in my face

But I've come through"

Queen

Prefácio

O estudo do endotélio corneano constitui uma importante plataforma para a evolução do tratamento das endoteliopatias oculares. As disfunções do endotélio corneano são a principal indicação para o transplante de córnea. O número reduzido de córneas disponíveis para transplante, bem como as dificuldades inerentes à quantidade de células e às suas condições de preservação em banco de olhos dificultam o processo de tratamento de doentes com perda de acuidade visual de origem corneana. Apesar dos largos anos de estudo do endotélio corneano, os avanços na compreensão deste tecido e das suas células são ainda restritos, acentuando a importância do seu estudo. Estes assuntos são detalhados no capítulo I no qual é realizada a contextualização teórica deste trabalho. No capítulo II, são descritos os objetivos do estudo exposto nesta dissertação sendo o objetivo primordial a expansão *ex vivo* das células de endotélio corneano, que se sabe, não apresentarem capacidade proliferativa, *in vivo*.

Deste modo e com base na literatura, os trabalhos precedentes à presente dissertação passaram, inicialmente, pela otimização das condições de cultura celular até se obter um protocolo de cultura reprodutível, seguida de estudos de imunocitoquímica para análise das células das culturas obtidas. Considerando a natureza deste trabalho e com o propósito de facilitar a sistematização e a compreensão optou-se por descrever no capítulo IV as metodologias adotadas para o estabelecimento das culturas primárias e os respetivos resultados obtidos para cada procedimento. No capítulo V são descritos os estudos de imunocitoquímica que foram realizados com vista a caracterizar as culturas primárias obtidas, apresentando métodos e respetivos resultados.

Este trabalho permitiu o estabelecimento de um protocolo reprodutível de obtenção de culturas primárias de células de endotélio corneano, sendo no capítulo 6 discutidos os aspetos mais relevantes e no capítulo VII enumeradas as principais conclusões. No futuro, perspetiva-se que este trabalho possa contribuir para a realização de estudos morfológicos e fisiológicos que poderão garantir melhor conhecimento das características das células de endotélio corneano, das suas funções enquanto tecido e potencial de aplicação em medicina regenerativa.

Agradecimentos

A chegada ao fim deste ciclo só foi possível devido a várias pessoas às quais não posso deixar de demonstrar o meu apreço.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço o voto de confiança que me foi dado, a sua orientação, partilha de conhecimento, e disponibilidade que demonstrou ao longo deste trabalho científico.

Ao Professor Doutor Miguel Morgado, coordenador do curso de Engenharia Biomédica, por toda a ajuda e por se ter mostrado sempre disponível no decorrer do meu percurso académico.

À Doutora Mafalda Laranjo agradeço pela orientação científica informal dedicada e paciente, pelo estímulo ao espírito crítico, pelo incentivo nos momentos menos bons, pela compreensão. Agradeço também pela amizade demonstrada.

À Professora Doutora Margarida Abrantes agradeço por todos os momentos de descontração e pela disponibilidade demonstrada desde o primeiro dia.

À Doutora Ana Brito, ao Mestre João Casalta, à Mestre Catarina Mamede, ao Mestre Fernando Mendes e à Mestres Salomé Pires um sincero obrigada pelos sorrisos arrancados e toda a ajuda prestada.

A toda a malta da Biofísica, a Ana Cláudia, o Baptista, o Crispim, a Denise, o Gonçalo, a Kathleen, a Tânia, a Renata, o Sales, a Sara, a Stephanie e todos os outros que tornaram tudo mais fácil com as brincadeiras e barbaridades que partilhamos agradeço a receção e envolvimento que me permitiram. À Ana Isabel por toda a ajuda prestada e horas de conversa fiada, ao Teixo pelos cafés, Halls e ajuda constante e ao Telmo por toda ajuda compreensão, incentivo e claro pelas horas de tricot deixo também o meu agradecimento.

Aos Pxinxos e Txufas agradeço a amizade que demonstraram em todos os momentos da minha vida académica. Às minhas Mosquetas, “Capitolina Andrioleta” e “Priscila Sóraia”, à Luisa Neves e ao Duarte Lopes um especial obrigada.

À Martita, à Diana “Ás de Copas” Mendes e à Ana Madeira um agradecimento por se manterem presentes e amigas apesar da distância que nos separa. Ao Domingos agradeço as conversas sérias e amigas que, pelo menos uma vez por ano, partilhamos.

Às manas Cavaleiras Ana Lopes, Ivone Nunes, Silvana Santos agradeço por se mostrarem sempre disponíveis e por todos os momentos em que ri até a barriga doer.

Ao meu choquito Pedro Cavalheiro agradeço por toda a amizade e pelos nossos acesos debates de ideias.

Agradeço, ainda, a toda a malta da Cova-Gala que de uma forma ou de outra esteve presente nesta etapa da minha vida.

À Ana Gomes e ao Carlos Lima agradeço por toda a paciência que têm para me aturar, por me conhecerem, me ouvirem e não fugirem, por todas as loucuras e viagens, pela preocupação, pelos chás de todas as horas, pela ajuda e guarida na escrita desta dissertação, enfim por serem os meus irmãos de coração. Agradeço também à Charlene Santos, Paula Almeida e Susana Moreira por se juntarem a esta família de amigos.

Ao meu Mano pelo apoio e amor demonstrados, por me ensinar o que é Coimbra, me ajudar com a sua experiência pessoal e por ser o meu ídolo agradeço de coração. Agradeço à minha afilhada Laurinha que mesmo sem se aperceber foi a motivação, inspiração e força nos momentos de pânico. Agradeço ainda à minha cunhada Susana pela alegria que a caracteriza e toda a amizade, compreensão, incentivo e confiança.

Aos meus pais agradeço por tudo o que sou, que conquistei e hei-de conquistar, porque a eles o devo. Agradeço todo o amor, todo o esforço que fizeram, por nunca desistirem de mim, pelos ralhetes e tudo aquilo que os melhores pais do mundo são capazes de proporcionar, pelo conforto que encontro nos seus olhares e tantas outras coisas que me são essenciais. Por tudo, um sincero obrigada. Não poderia deixar de agradecer também aos meus avós e madrinha por todos os mimos e carinho que sempre me deram.

Índice

Prefácio	VII
Agradecimentos	XI
Índice	15
Resumo	20
Abstract	24
Capítulo I - Introdução	28
A córnea e os seus constituintes: a importância do endotélio	30
Capacidade proliferativa do endotélio corneano: da embriologia à relevância clínica	33
Patologias do endotélio corneano	35
Distrofia Endotelial de Fuchs	36
Distrofia Endotelial Hereditária Congênita	38
Distrofia corneana polimorfa posterior	40
Queratopatia bolhosa pós-cirúrgica	41
Transplantes de córnea	42
Técnicas de cultura de células endoteliais	47
Células estaminais endoteliais	51
Marcadores celulares	53
Modelos Animais	54
Capítulo II - Objetivos	56
Capítulo III - Materiais	60
Material biológico	62
Meio de Cultura e Digestão Enzimática	65
Revestimento de Placas de Cultura	66

Capítulo IV - Estabelecimento de Culturas Primárias	68
Protocolo I	70
Protocolo II	71
Protocolo III	74
Protocolo IV	76
Protocolo V e Protocolo VI	77
Protocolo VII, Protocolo VIII e Protocolo IX	78
Capítulo V-Estudos de Imunocitoquímica	82
Capítulo VI- Discussão	90
Capítulo VII - Conclusão	102
Lista de Abreviaturas	106
Referências Bibliográficas	110

Resumo

O endotélio corneano é a camada mais importante da córnea, sendo responsável pela difusão de nutrientes e por regular o seu nível de hidratação, mantendo, assim a transparência corneana. As células endoteliais corneanas não apresentam capacidade proliferativa *in vivo* em humanos e a perda celular no endotélio corneano é compensada pela migração e pelo alargamento celular. A morfologia hexagonal destas células permite-lhes cumprir as suas funções, assim, quando o número de células atinge um limiar, estas células perdem a sua capacidade funcional causando perda da acuidade visual progressiva, podendo culminar em cegueira corneana.

A disfunção endotelial corneana é a responsável pela maioria das indicações para a realização de transplante corneano em todo o mundo. Os transplantes de córnea são difíceis devido à possibilidade de rejeição, ao facto das contagens celulares serem críticas nas córneas doadas e, também, pela insuficiência de córneas doadas disponíveis face às necessidades. Este facto justifica a importância da expansão de células endoteliais corneanas, que pode permitir o estudo da biologia destas células e a avaliação de potenciais formas de tratamento de patologias do endotélio corneano.

Após a colheita do material através do *peeling* da membrana de Descemet de anéis córneo-esclerais de humanos e de ratos Wistar, debaixo de microscópio cirúrgico, a cultura celular foi estabelecida. Para tal foram testadas várias condições de cultura, nomeadamente a digestão enzimática, a composição do meio de cultura, a presença de suplementos como o soro bovino fetal e a albumina sérica de bovino, a suplementação do meio com fatores de crescimento e o revestimento de placas e de frascos de cultura.

No protocolo de digestão adotado utilizou-se collagenase a 0,04% em DMEM-F12, por um período de 24 horas seguido de 10 minutos em tripsina/EDTA 0,25%. O meio de cultura eleito consistiu em DMEM-F12 suplementado com 15% de FBS. As culturas foram estabelecidas em placas revestidas com poli-L-lisina. Este método foi bem sucedido e reprodutível, tendo permitido manter as culturas por várias passagens.

De modo a confirmar a origem das culturas primárias realizaram-se estudos de imunocitoquímica. Estes estudos visaram avaliar proteínas que se sabem ser parte integrante das células de endotélio corneano, como a Na^+/K^+ ATPase e a ZO-1 e também proteínas presentes em células imaturas como a nestina e a COL1 α 1. A expressão das proteínas Na^+/K^+ ATPase, a nestina e a COL1 α 1 verificou-se ser elevada enquanto a

expressão da proteína ZO-1 foi baixa ou inexistente. Estes resultados permitiram assumir que as células em cultura não se encontravam completamente diferenciadas, justificando a fraca marcação da proteína ZO-1.

Neste trabalho foi possível estabelecer um protocolo de expansão de células endoteliais corneanas de ratos Wistar. As culturas primárias estabelecidas expressaram marcação de proteínas específicas das células endoteliais corneanas. Conclui-se, pois, com elevado grau de confiança, que as culturas primárias obtidas são culturas com origem em células endoteliais corneanas.

Abstract

Corneal endothelium is the most important layer of the cornea, once it is responsible for nutrient diffusion and corneal hydration maintaining corneal transparency. Corneal endothelial cells have no proliferative capacity in vivo in humans. Corneal endothelium cell loss is offset by cell enlargement and migration. Corneal endothelial cells hexagonal morphology allows them to fulfill their functions. Therefore when cell counts reach a threshold, these cells lose their functional capacity, causing progressive loss of visual acuity resulting in corneal blindness.

Corneal endothelial impairment is the major reason for corneal transplantation indication worldwide. Corneal transplants are difficult because of the rejection possibility, critical cell counts in donor corneas and also the small number of donor corneas. Hence the importance of expanding corneal endothelial cells, which can allow biology studies of these cells and evaluation of potential treatments for corneal endothelium disorders.

After material collection, by peeling off the Descemet's membrane of the corneal-scleral rings of humans and Wistar rats, under a surgical microscope, cell culture was established. Various culture conditions were tested, namely enzymatic digestion, composition of culture medium, presence of serum such as fetal bovine serum and bovine serum albumin, supplementation of medium with growth factors and culture plates and flasks coating.

In the digestion protocol adopted we used 0,04 % collagenase in DMEM-F12 during 24 hours followed by 10 minutes in 0,25 % trypsin/EDTA . The chosen culture medium consisted of DMEM-F12 with 15% of FBS. Cultures were established in poli-L-lisine coated plates. This was a successful and reproducible method, allowing culture maintenance during several passages.

In order to confirm the cultures origin immunocytochemistry studies were performed. These studies targeted the analysis of proteins known to be present in the corneal endothelium, such as Na^+/K^+ ATPase and ZO-1, and also proteins known to be present in immature cells, as nestin and COL1 α 1. While the proteins Na^+/K^+ ATPase, nestin and COL1 α 1 revealed high expression, ZO-1 expression was low or absent. These results allowed to assume that cultured cells weren't fully differentiated, justifying the low expression of ZO-1.

It was possible to establish a Wistar rat corneal endothelial cells expansion protocol. The established primary cultures expressed corneal endothelial cells specific proteins. Therefore, it was possible to conclude, with high level of confidence, that the obtained cultures had corneal endothelial cell origin.

Capítulo I - Introdução

A córnea e os seus constituintes: a importância do endotélio

A córnea é uma estrutura transparente, localizada na parte mais anterior do globo ocular, responsável por dois terços do poder refrativo do olho. Juntamente com a esclera na parte posterior, forma a parede do globo ocular, como esquematizado na Figura 1¹⁻⁴.

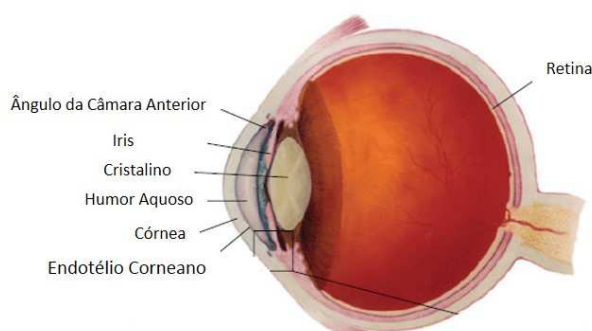


Figura 1: Diagrama esquemático do olho humano. Adaptado de Yu et al.⁵

A córnea é formada por cinco camadas distintas: o epitélio, a membrana de *Bowman*, o estroma, a membrana de *Descemet (DM)*, e o endotélio, representadas na imagem da Figura 2. Em média, a córnea tem aproximadamente 520µm de espessura, dos quais 10% correspondem ao epitélio, 5µm ao endotélio e o restante (cerca de 450µm) ao estroma⁵⁻⁸

O epitélio é escamoso, estratificado e não queratinizado e funciona como principal barreira protetora. A membrana de *Bowman* constitui o limite anterior do estroma. A membrana de *Descemet* é uma verdadeira lâmina basal do endotélio, situada na face posterior do estroma. É sintetizada pelo endotélio da córnea e a sua espessura aumenta com a idade⁶. O endotélio está na superfície posterior da córnea, voltado para a câmara anterior, em contacto com o humor aquoso². É composto por uma camada única de células hexagonais dispostas regularmente, com cerca de 5 µm de espessura e de 20 µm de diâmetro, como se pode observar na Figura 3^{7,9,10}.

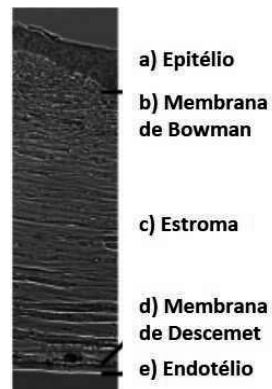


Figura 2: A córnea humana é uma estrutura transparente constituída por cinco camadas a) Epitélio; b) Membrana de Bowman; c) Estroma; d) Membrana de Descemet; e) Endotélio. Imagem retirada de Peh *et al.* ⁶.

O endotélio é considerado a camada mais importante da córnea, tendo como principal função a manutenção da transparência da córnea, regulando a sua hidratação, ao mesmo tempo que permite a difusão de nutrientes do humor aquoso para a córnea avascular ^{6,8}.

As células do endotélio são caracterizadas pela sua forma hexagonal única, como representado na Figura 3, que lhes permite a disposição em monocamada e o consequente desempenho ótimo das suas funções.

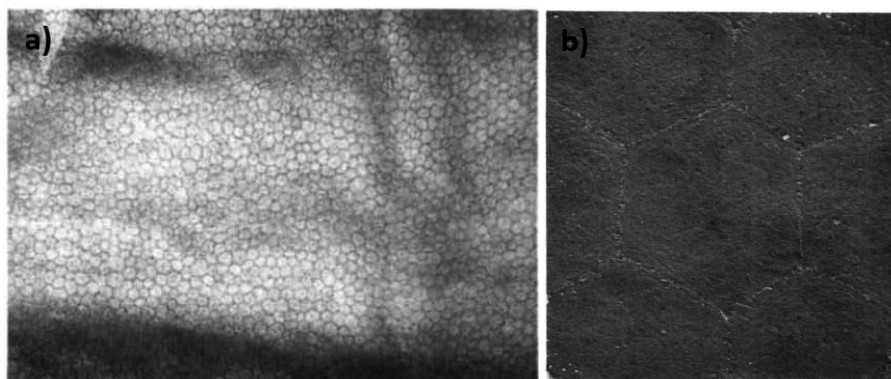


Figura 3: A estrutura do endotélio corneano. a) Detalhes das características da superfície do endotélio corneano através de microscopia especular. b) Detalhes das características da superfície do endotélio corneano através microscopia eletrônica. Imagem adaptada de Tuft e Coster, 1990 ¹¹.

O endotélio funciona como uma barreira porosa com permeabilidade seletiva a nutrientes, mas impede a livre passagem de fluido para o estroma através das *tight junctions*^{2,12-14}. Ao mesmo tempo, remove ativamente o excesso de fluido a partir do estroma para a câmara anterior através de bombas de fluidos iônicos, evitando assim o excesso de hidratação da córnea. Estas bombas são bombas Na^+/K^+ ATPase, descrita na Figura 4, e a Mg^+ ATPase, que estão localizadas, lateralmente, na membrana plasmática destas células^{8,2}. O equilíbrio dinâmico entre a barreira porosa e bomba de transporte ativo regula a hidratação da córnea, mantendo-a transparente. Além das funções de barreira e da existência de bombas de transporte ativo, as células endoteliais são responsáveis pela síntese da membrana de Descemet, a sua membrana basal^{7,15-17}.

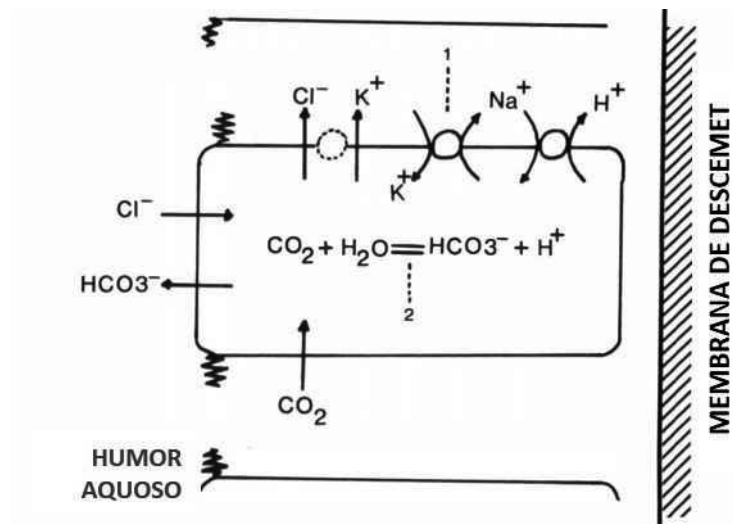


Figura 4: Mecanismos da bomba iónica sódio-potássio. A bomba sódio-potássio pode ser inibida por inibidores da anidrase carbónica (1) ou por ouabaína (2). Imagem adaptada de Tuft e Coster, 1990¹¹.

Capacidade proliferativa do endotélio corneano: da embriologia à relevância clínica

Embriologicamente, a córnea é uma das últimas estruturas do olho a ser formada e o seu desenvolvimento envolve a interação da vesícula do cristalino com a superfície da ectoderme ¹⁸. O endotélio corneano é formado a partir da primeira onda de células mesenquimais derivadas da crista neural que migram entre a superfície da ectoderme e o cristalino ^{1,5,8,11}. O desenvolvimento da córnea começa por volta do 33º dia pós-fertilização ⁵. Em torno do 40º dia, uma fila dupla de células achatadas posterior à lâmina basal do epitélio corneano é produzida pelo mesênquima e desenvolve-se numa monocamada de endotélio corneano até à décima oitava semana ⁵. Neste momento, o endotélio corneano estende-se praticamente ao recesso angular. Esta membrana endotelial que cobre o recesso angular começa a regredir por volta das 15 semanas de gestação, atingindo o aspeto final até à 18ª semana ^{5,19}.

Após o nascimento, há pouca ou nenhuma proliferação do endotélio da córnea ²⁰. Existe uma relação inversa entre idade e a densidade das células endoteliais ⁶. A densidade celular do endotélio corneano, para bebés de 2 meses de idade, tem sido relatada como sendo cerca de 5624 células/mm², com uma média de 4252 células/mm² no primeiro ano de idade ⁶. A densidade de células endoteliais diminui rapidamente durante os primeiros anos de vida e está associada ao aumento do tamanho da córnea, devido ao crescimento normal do olho ⁶. Aos 5 anos de idade, a densidade endotelial é de aproximadamente 3591±399 células/mm² que cai para aproximadamente 2697±246 células/mm² até aos 10 anos de idade ^{6,11}. A taxa de perda de células endoteliais atenua durante a vida adulta, fixando-se em aproximadamente 0,6% ao ano, o que também indica que as células endoteliais da córnea humana têm uma capacidade limitada, ou mesmo inexistente, para proliferar *in vivo* ^{5,6}.

Está relatado que as células do endotélio da córnea humana têm telómeros de comprimento normal, por conseguinte a sua incapacidade para proliferar *in vivo* não é

devida ao encurtamento de telômeros. Joyce *et al.* mostraram que as células endoteliais da córnea humana estão bloqueadas na fase G1 do ciclo celular *in vivo* ²¹. Os seus estudos subsequentes sugeriram que a inibição dependente de contacto desempenha um papel importante na indução da paragem do ciclo celular, que poderá estar na dependência do TGF- β 2 (fator de crescimento transformante beta 2, do inglês, *transforming growth factor beta 2*), presente no humor aquoso, mantendo assim o endotélio num estado quiescente ^{21,22}. Embora o endotélio da córnea humana esteja mantido num estado não replicativo *in vivo*, experiências *ex-vivo* mostraram que estas células mantêm a capacidade proliferativa, como por exemplo após tratamento com EDTA, que provoca a disrupção das junções intercelulares ^{6,23,24}.

Como as células do endotélio da córnea humana não são capazes de se dividir *in vivo*, quando ocorre perda endotelial, a estratégia de reparação passa pelo aumento do tamanho das células e migração para os locais onde o número de células ficou deficitário, numa tentativa de manter a sua integridade funcional, sustentando a deturgescência da córnea e a sua transparência ^{10,22,25}. Por esse motivo, verifica-se um aumento da variabilidade da forma (pleomorfismo) e do tamanho (polimegatismo) das células endoteliais ^{6,19,26}.

Apesar do declínio fisiológico associado à idade, a reserva de células endoteliais é, geralmente, suficiente para manter a barreira crítica e a função de bomba durante toda a vida humana, sem a necessidade de intervenção clínica ⁶. No entanto, em casos de perda aguda e/ou acelerada de células endoteliais devido a doenças como uma distrofia endotelial de base genética ou o trauma acidental ou cirúrgico, a descompensação do endotélio da córnea pode ocorrer, causando edema corneano ⁶. A função do endotélio será comprometida se a densidade das células endoteliais diminuir abaixo do limiar crítico de 500-1000 células/mm². Isto resulta em edema do estroma, diminuição da transparência da córnea e perda da acuidade visual. Em tais casos, a única opção existente para restaurar a visão é substituir o endotélio ineficaz através de um transplante de córnea ⁶.

Patologias do endotélio corneano

Existem relativamente poucas doenças primárias do endotélio da córnea, sendo a mais comum a distrofia de Fuchs, uma doença bilateral hereditária, na qual as células endoteliais se perdem gradualmente^{26,27}

O termo distrofia endotelial da córnea refere-se a um grupo de doenças que são caracterizadas pela degeneração progressiva do endotélio corneano e que exibem, pelo menos em parte, predisposição genética^{6,28}. As distrofias endoteliais corneanas são a distrofia hereditária congénita tipo 1, distrofia hereditária congénita tipo 2, distrofia endotelial corneana polimorfa posterior, a distrofia endotelial corneana de Fuchs, o endotélio pode, ainda, degenerar na sequência de um trauma como na queratopatia bolhosa pós-cirúrgica^{29,30}. Em todos estes casos, a degeneração do endotélio leva, em última análise, a uma perda grave da acuidade visual. No entanto, os mecanismos moleculares destas patologias permanecem largamente desconhecidos. Esforços recentes trouxeram maior grau de conhecimento sobre os mecanismos moleculares destas patologias, e as últimas descobertas genéticas reforçam a ideia de um contínuo entre as várias distrofias endoteliais²⁹. Foram detetadas semelhanças histológicas entre as várias distrofias endoteliais corneanas, especialmente entre a distrofia corneana polimorfa posterior e a distrofia endotelial hereditária congénita, observando-se células semelhantes a fibroblastos, células endoteliais degeneradas, e células tipo melanócitos, na porção posterior da córnea e na membrana de Descemet. Da mesma forma, as semelhanças entre distrofia endotelial de Fuchs, a distrofia corneana polimorfa posterior e as perdas endoteliais relacionadas com a idade são muitas, como o aparecimento de excrescências, o pleomorfismo e o polimegatismo. A razão para tais semelhanças reside, provavelmente, no facto de o endotélio da córnea, como tipo celular, ter uma capacidade semelhante para responder à exposição intrínseca (induzida por defeito genético) e à exposição extrínseca (como a exposição à luz ultravioleta e ao envelhecimento) e ao stresse, independentemente da etiologia. Pode então dizer-se que, os sinais clínicos e/ou as características morfológicas podem não ser suficientes para diferenciar entre as várias distrofias e as diversas condições endoteliais corneanas.

Assim, o verdadeiro futuro de classificação das distrofias corneanas encontra-se na análise genética. Porém, não se pode subestimar o impacto da interação entre fatores ambientais e genéticos que, provavelmente, representam a multiplicidade de variações fenotípicas e semelhanças entre endoteliopatias da córnea²⁹.

Distrofia Endotelial de Fuchs

A distrofia endotelial de Fuchs é considerada uma patologia do envelhecimento e caracteriza-se pela perda celular endotelial progressiva, pela alteração da morfologia no mosaico hexagonal endotelial, e pela formação concomitante de depósitos extracelulares, a que se dá o nome de *guttae*. À medida que o número de células endoteliais se torna perigosamente baixo, a córnea torna-se edematosa, o que leva à perda da visão, como se pode observar na Figura 5^{29,31}.

Na grande maioria dos casos, a distrofia de Fuchs é lentamente progressiva³². Nos Estados Unidos afeta aproximadamente 4% da população com idade acima dos 40 anos. Atualmente, o único tratamento disponível para restaurar a visão é o transplante de córnea na forma de queratoplastia penetrante ou *Descemet stripping endothelial keratoplasty*³³. A distrofia de Fuchs é a segunda indicação mais comum para o transplante de córnea²⁹.

Em estados muito avançados da doença, a distrofia de Fuchs manifesta-se em todas as camadas da córnea, o que torna inviável a realização de transplante lamelar posterior. Investigações com recurso a microscopia especular ou confocal revelaram que o cunho histológico da distrofia de Fuchs é o espessamento difuso da membrana de *Descemet* e a acumulação crescente de depósitos extracelulares, as *guttae*, também na membrana de *Descemet*²⁹. As *guttae* localizam-se inicialmente no centro da córnea e com a evolução da doença, tendem a ocorrer também na periferia. A acumulação de *guttae* é acompanhada por perda celular, pelo que o número de células é inversamente proporcional ao número de *guttae*²⁹.

Estudos histológicos e ultra-estruturais de amostras de doentes com distrofia de Fuchs revelaram anomalias das células endoteliais, como grandes vacúolos intracelulares, frequentemente repletos de depósitos de pigmento (tipo melanina) ^{28,29}. Além disso, depósitos extracelulares de pigmento foram encontrados em torno das *guttae* ³⁴. Em muitos casos, as células endoteliais desenvolvem um retículo endoplasmático rugoso dilatado, bem como apresentam mitocôndrias lesadas.

As células endoteliais com distrofia de Fuchs tendem a perder as suas características fenotípicas e sofrem metaplasia, exibindo morfologia epitelial e fibroblástica, e até mesmo, a presença de marcadores de células epiteliais ³².

Clinicamente, duas formas de distrofia endotelial de Fuchs têm que ser diferenciadas. Uma forma rara de início precoce de distrofia de Fuchs, que começa na primeira década de vida e progride através da segunda e da terceira décadas. É caracterizada por uma membrana de Descemet maciçamente espessa ao nascimento, causando descompensação da córnea numa idade muito precoce. Porém, a forma mais comum tem início tardio, é mais frequente em mulheres e progride através de quatro estágios clinicamente definidos que se estendem ao longo de duas a três décadas ^{29,32}. Considerando os quatros estágios evolutivos, no estágio 1, os doentes geralmente são assintomáticos. A biomicroscopia da córnea revela *guttae* isolados, não confluentes. A microscopia especular ou confocal serve como uma ferramenta útil para documentar a presença de *guttae* e realizar análises morfométricas às células endoteliais, que auxiliam no diagnóstico e na caracterização do estágio ^{29,32}. No estágio 2, as *guttae* sofrem aglutinação e a perda de células endoteliais acentua-se, com aumento do tamanho celular e com perda da forma hexagonal. Estas alterações vão determinar, visão flutuante ao longo do dia com agravamento matutino ²⁹. Por sua vez, no estágio 3 a perda continuada de células endoteliais leva a um compromisso na função de barreira e na função de bomba, resultando em edema corneano difuso, com atingimento da camada de células epiteliais. Estas alterações vão ter como consequência uma diminuição significativa da visão⁵. Por fim no estágio 4, e devido ao edema crónico, a córnea torna-se densamente opaca, vascularizada e com cicatrizes ^{29,32}

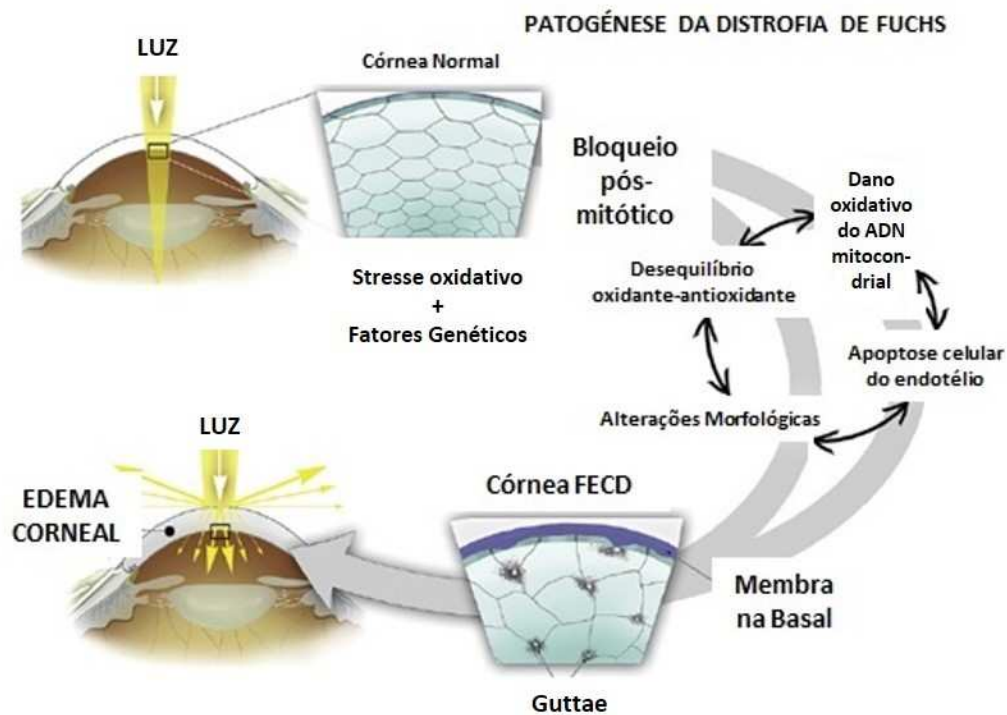


Figura 5: Representação esquemática da progressão da distrofia endotelial de Fuchs. O stresse oxidativo, associado a fatores genéticos, promovem desequilíbrios entre componentes oxidativos e antioxidativos, bem como danos no ADN mitocondrial que provocam a apoptose das células de endoteliais da córnea que culminam em alterações morfológicas que, por sua vez, incrementam os desequilíbrios, tendo efeito de retrocontrole positivo. Dá-se a formação de guttae e consequente edema corneano. Imagem adaptada de T.Shemedt *et al* ²⁹

Distrofia Endotelial Hereditária Congénita

Têm sido descritos dois tipos de distrofia endotelial hereditária congénita: a distrofia endotelial hereditária congénita do tipo 1, que é autossómica dominante, e a distrofia endotelial hereditária congénita do tipo 2, que é autossómica recessiva. Clinicamente, as duas doenças apresentam córneas com aspeto difuso de vidro fosco bilateral e córneas marcadamente espessas. A biomicroscopia revela que a espessura da córnea pode estar até três vezes maior que o normal. O edema da córnea deve-se à escassez de células endoteliais ou à sua completa degeneração ^{29,34}.

As principais diferenças entre a distrofia endotelial hereditária congénita do tipo 1 e a distrofia endotelial hereditária congénita do tipo 2 são, para além do início da patologia, a forma de transmissão hereditária, as mutações genéticas e as condições associadas. Em geral, a visão tende a ser melhor em doentes com distrofia endotelial hereditária congénita do tipo 1 do que naqueles com distrofia endotelial hereditária congénita do tipo 2 ²⁹.

No que respeita à distrofia endotelial hereditária congénita do tipo 1 é uma patologia autossómica dominante, e o locus genético foi identificado na região pericentromérica do cromossoma 20. Clinicamente, as crianças com distrofia endotelial hereditária congénita do tipo 1 apresentam córneas claras ao nascimento com desenvolvimento de opacidade da córnea durante o primeiro ou o segundo ano de vida. A sua apresentação é muitas vezes assimétrica e a opacidade da córnea varia entre a turvação discreta branco-leitosa e leucomas focais. A aparência endotelial em doentes assintomáticos pode apresentar-se tipo crateras da lua e alterações do tipo pele de laranja. A microscopia ótica mostra a deposição de fibras de colagénio desorganizadas, que se pensa serem secretadas pelas células endoteliais metaplásicas. Como resultado, há espessamento difuso da membrana de Descemet sem a presença de *guttae*. O endotélio corneano é, em grande parte, atrófico com vacuolização, com formação de multicamadas e com depósitos de melanina ^{29,32}.

A distrofia endotelial hereditária congénita do tipo 2 é autossómica recessiva, muitas vezes assimétrica, e é mais comum e mais grave do que a distrofia endotelial hereditária congénita do tipo 1. As córneas são edematosas e têm a aparência de vidro moído difuso que é evidente ao nascimento ou no período neonatal. O nistagmo está muitas vezes presente devido à perda precoce e acentuada da visão. Quando associada a surdez faz parte da síndrome Harboyan ²⁹.

Ainda que as distrofias endoteliais hereditárias congénitas do tipo 1 e do tipo 2 sejam histopatologicamente semelhantes, existem diferenças subtis na composição da membrana de Descemet. A membrana de Descemet na distrofia endotelial hereditária congénita tipo 2 está consistentemente espessada, devido ao aumento da zona não estriada (cinco a oito vezes mais espessa do que o normal), enquanto a zona fetal

anterior estriada é de espessura e morfologia normais. O endotélio é normalmente atenuado e ausente ⁵.

Distrofia corneana polimorfa posterior

A distrofia corneana polimorfa posterior é uma doença rara, não progressiva que afeta o endotélio corneano e a membrana de Descemet ³⁵. Foi descrita pela primeira vez em 1916 por Koeppe, e é uma distrofia autossômica dominante, que se manifesta bilateralmente ³⁵. Apesar de terem sido descritos casos unilaterais isolados com fenótipos semelhantes, os padrões hereditários eram pouco claros pelo que a prevalência desta doença rara é desconhecida. Clinicamente, a distrofia corneana polimorfa posterior é caracterizada por lesões profundas ou difusas, geralmente assimétricas. Os doentes são muitas vezes assintomáticos até à meia-idade e o deficit visual, como consequência do edema corneano, só ocorre numa pequena percentagem de doentes. As características associadas são o aparecimento de aderências iridocorneanas periféricas, o glaucoma, e uma tendência para a recidiva no enxerto após queratoplastia penetrante³⁵. Três tipos de distrofia corneana polimorfa posterior com diferentes *loci* genéticos foram identificados: a distrofia corneana polimorfa posterior 1, relacionada com o cromossoma 20, distrofia corneana polimorfa posterior 2, relacionada com o cromossoma 1, e distrofia corneana polimorfa posterior 3, relacionada com o cromossoma 3⁹. O endotélio da córnea com distrofia corneana polimorfa posterior apresenta muitas vezes lesões, as quais, por microscopia especular, têm uma forma vesicular com aparência de rosca e com, anéis escuros com centros mais claros onde reside o endotélio. Observam-se, muitas vezes, nichos de células anormais que se aglomeram perto do endotélio normal. São também observadas áreas em forma de banda como cadeias de vesículas que se sobrepõem, criando uma vala pouco profunda, com bordos irregulares. Na membrana Descemet são também observadas alterações da morfologia, com aparecimento de poços, excrescências, vales e cumes. O

polimegatismo e o pleomorfismo endotelial também podem ser observados em doentes com distrofia corneana polimorfa posterior ^{29,34,35}.

Estudos histológicos e de microscopia eletrônica demonstraram que a principal característica morfológica da distrofia corneana polimorfa posterior é a substituição das células endoteliais por epitélio escamoso, que é comumente estratificado e tem sinais de queratinização anômala. Estas células, tipo epiteliais, formam entre uma a cinco camadas, são unidas por desmossomas abundantes e têm microvilosidades na superfície e filamentos intracitoplasmáticos. A membrana de Descemet aparece com várias camadas de colagénio que mostram espessamento irregular e manifestam excrescências focais nodulares ou fusiformes. Na distrofia corneana polimorfa posterior, a parte não estriada posterior da membrana de Descemet é extremamente fina e, por vezes, mesmo inexistente. As células endoteliais anormais podem estender-se para a rede trabecular, o que pode conduzir a glaucoma secundário, nos casos mais graves. Para caracterizar o endotélio corneano afetado pela distrofia corneana polimorfa posterior, anéis corneanos pós-queratoplastia de doentes foram alvo de testes de imunohistoquímica. As células marcaram positivamente um amplo espectro de citoqueratinas, como a citoqueratina 7 e a citoqueratina 19 ^{29,34}. Os investigadores concluíram que o padrão de expressão de citoqueratina encontrado nas células anormais está, muito provavelmente, relacionado com um processo de metaplasia durante o qual as células endoteliais se transformam em células epiteliais. Porém, os mecanismos exatos desta formação ainda não foram estabelecidos ²⁹.

Queratopatia bolhosa pós-cirúrgica

A queratopatia bolhosa é uma doença corneana visualmente incapacitante devido à disfunção e a descompensação celular endotelial que leva ao edema corneano irreversível e é comumente indicada para queratoplastia penetrante ^{30,36,37}. Ocorre devido a perda celular acentuada durante intervenções cirúrgicas intraoculares, como a remoção de cataratas ^{38,39}. Os doentes com patologia endotelial prévia, como a Distrofia

de Fuchs, estão particularmente vulneráveis quando se submetem a intervenções deste tipo ^{38,39}. Com a função de bomba endotelial insuficiente, a córnea fica edemaciada, por acumulação de fluido estromal, entre as fibras de colagénio. O espaçamento das fibras de colagénio da córnea alterada afeta a sua transparência e leva à difusão da luz com uma redução da função visual. Este quadro agrava-se quando o epitélio se torna edematoso com a formação de bolhas, como se pode observar na Figura 6 o que leva à perda profunda da visão e a uma dor incapacitante.

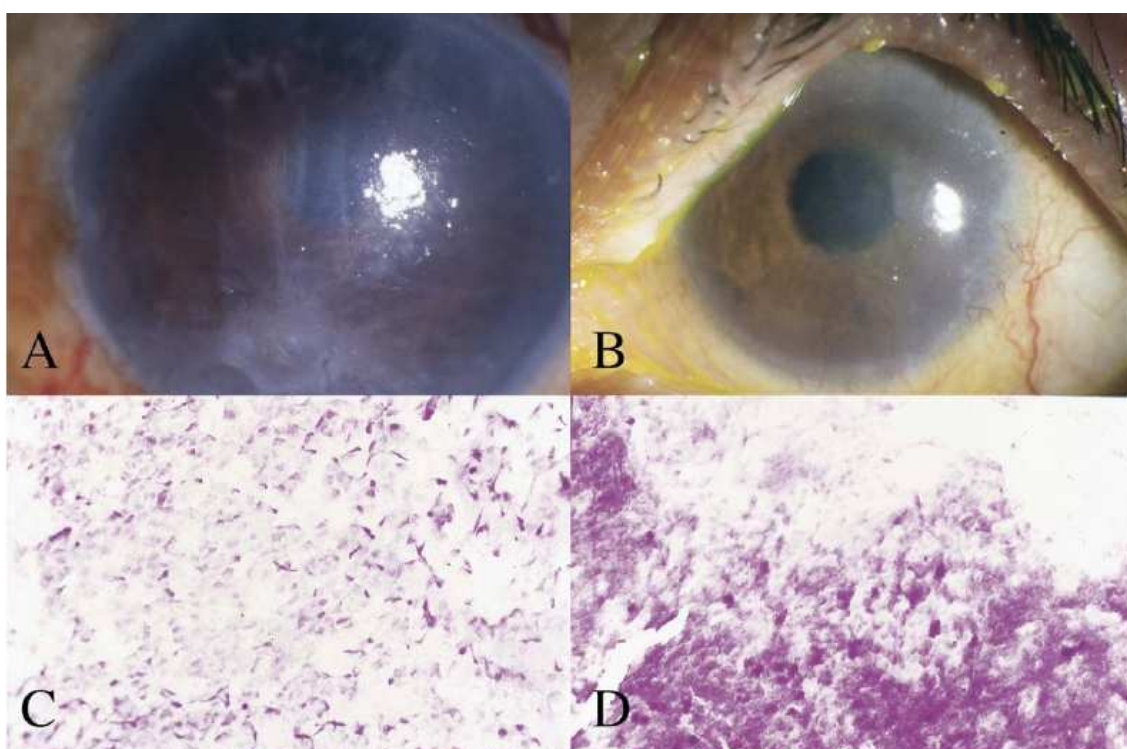


Figura 6: Fotografias de lâmpada de fenda (em cima) representativas e espécimes de citologia de impressão (em baixo) de queratopatia bolhosa, coloração com ácido schiff. A: Caso representativo de queratopatia bolhosa pseudofácica sem neovascularização. B: Caso representativo de queratopatia bolhosa com neovascularização. C: Imagem citológica de um caso de queratopatia bolhosa sem neovascularização. D: Imagem citológica de um caso de queratopatia bolhosa com neovascularização. Imagem retirada de Uchino *et al.* ³⁰.

Embora a redução do edema da córnea possa ser parcialmente alcançada com a exposição a uma solução uma salina e/ou a soluções hipertónicas, tais como uma

solução de dextrano, a compactação permanente e completa das fibras de colagénio com restauração da transparência corneana não é possível nestas córneas edematosas. De facto, esta restauração só é possível pela substituição cirúrgica das células endoteliais através da queratoplastia lamelar penetrante ³⁶.

Por vezes, e sobretudo em casos de evolução mais arrastada, a queratopatia bolhosa pós-cirúrgica pode apresentar neovascularização. No entanto, a sua etiologia não é clara. Tem sido relatado um aumento de citocinas inflamatórias, metaloproteases de matriz e do fator de crescimento vascular endotelial no tecido estromal edemaciado, sugerindo que a exposição da córnea a estes agentes a longo prazo pode estimular a neovascularização ³⁰.

Transplantes de córnea

Estima-se que vinte e nove milhões de pessoas em todo o mundo sofram de cegueira por doença corneana. Atualmente, cerca de cem mil transplantes de córnea (queratoplastias) são realizados anualmente no mundo. De modo a obter este número de córneas, cerca de duzentas e vinte mil córneas têm de ser processadas a cada ano contando, apenas, com os bancos de olhos dos Estados Unidos da América e da Europa ⁴⁰. A cegueira corneana por disfunção endotelial, é a segunda principal causa de cegueira, ficando apenas atrás das cataratas⁴¹.

O artigo de revisão de 2011 da autoria de Peh *et al.*, refere que as projeções da população dos países desenvolvidos indicam que o número de pessoas com 50 anos ou mais aumentou substancialmente durante as últimas décadas, e a pressão sobre os sistemas de saúde em todo o mundo será sem precedentes ao longo do século XXI. Assim, existirá, muito provavelmente, um aumento gradual de indivíduos mais velhos que sofrem de doenças relacionadas com a idade, daí, uma maior necessidade de córneas para transplante. A escassez de córneas doadas que se verifica atualmente em muitos países irá certamente agravar-se num futuro relativamente próximo ⁶.

A escassez de tecidos prende-se não só com a escassez de doadores mas também com a qualidade dos tecidos obtidos ⁴². O botão corneano deve obedecer a diretrizes rigorosas para que possa ser transplantado. Estas incluem os testes serológicos e historial médico do dador, a ausência de anomalias estruturais (como opacidades, por exemplo) e a densidade de células endoteliais, que deve ser superior a 2000 células/mm². De facto, muitas córneas, muitas vezes provenientes de doadores idosos, são rejeitadas por apresentarem baixa contagem celular endotelial e/ou possíveis doenças relacionadas com a idade, como a distrofia de Fuchs ³². A disponibilidade de tecidos também é afetada por potenciais fatores culturais, logísticos e técnicos. Estes são alguns dos problemas que contribuem para a escassez mundial de tecidos de córnea para transplante ⁶.

Os transplantes de córnea apresentam taxas de sucesso elevadas (superiores a 90%), que se devem à existência de um certo grau de privilégio imunológico da córnea avascular. No entanto, a sobrevivência do enxerto corneano a longo prazo permanece uma limitação. As taxas de sobrevivência do enxerto após 5 e 10 anos caem para 74% e 64%, respetivamente, comparável com as taxas de sobrevivência do enxerto cardíaco, renal e transplante hepático aos 5 anos. Recentemente, foi demonstrada uma taxa de perda de células endoteliais de 70%, 5 anos após queratoplastia penetrante ⁶. Mesmo sob as melhores condições para o transplante, a falência do enxerto transplantado, devido a rejeição imunológica, infeção ou descompensação endotelial não imunológica, pode ocorrer, exigindo a substituição do enxerto. Isto é agravado pelo facto de que o re-transplante tem prognóstico significativamente pior em comparação com os procedimentos primários ⁶.

A causa *major* para a falência do transplante é a perda de células endoteliais. Uma vez que a proliferação do endotélio corneano *in vivo* é mínima ou mesmo inexistente, a perda destas células é permanente. A densidade celular endotelial é o critério chave para a aceitação de uma córnea dadora para uso clínico, assim como para a avaliação da qualidade de enxerto pós transplante. A perda celular durante o armazenamento é a principal razão para descartar tecidos nos bancos de olhos. Após transplante existe uma perda considerável e progressiva de células do endotélio. As perdas endoteliais estão na origem de 25% dos casos de falência do enxerto até 15 anos pós-transplante. A inibição

da apoptose do endotélio corneano tem sido sugerida como estratégia para melhorar a qualidade dos tecidos e prolongar os tempos aceitáveis de armazenamento em bancos de olhos⁴⁰.

Medicina regenerativa: Culturas de células endoteliais

Assistimos, na última década, a uma mudança no paradigma dos transplantes de córnea, estando as queratoplastias lamelares a ser preferidas em detrimento das penetrantes. Esse transplante de espessura parcial substitui apenas o tecido danificado, em vez de toda a córnea⁶. Uma vantagem imediata destes enxertos lamelares é a menor taxa de rejeição, uma vez que o tecido transplantado é menor, com consequente minimização da exposição a imunogénios.

A ideia de usar células endoteliais de córneas humanas cultivadas como alternativa ao transplante de córnea foi concebida há mais de três décadas. Potencialmente, o uso de tais substitutos do endotélio corneano com origem em engenharia de tecidos poderá dar resposta à escassez de tecidos que se verifica atualmente. Isto é especialmente adequado para o tratamento de endoteliopatias, em que o tratamento *gold-standard* atua é o enxerto lamelar posterior, como já referido. Assim, a capacidade para cultivar células endoteliais humanas *in vitro* com relativa consistência irá certamente estimular a investigação de um sistema de suporte adequado, sintético ou biológico, que permita o transporte e transplante destas células. A introdução destes “enxertos artificiais” na câmara anterior poderá ser feita, à semelhança dos DSAEK (do inglês, *Descemet stripping automated endothelial keratoplasty*) utilizando os mesmos dispositivos de inserção já desenvolvidos e aplicados na clínica atualmente⁶.

A cultura eficiente e substancial de células endoteliais seria uma enorme mais-valia. Por um lado, repovoar as córneas dadoras iria diminuir o número de tecidos excluídos por densidade celular insuficiente e melhoraria a qualidade dos tecidos transplantados, o que por si só aumenta a sobrevida do enxerto. Outra possibilidade seria aumentar o

número de células endoteliais de um doente com as suas próprias células cultivadas *ex vivo* (autoenxerto), evitando assim a possível rejeição de um transplante²⁴.

A criação *ex vivo*, de um lenticulo constituído por células endoteliais expandidas e respetiva membrana basal poderia substituir estes transplantes⁶. A construção de córneas artificiais através de engenharia de tecidos tem sido também equacionada para dar resposta à crescente procura de tecidos para transplante. Isto só é possível através da conjugação de técnicas de cultura celular (epitélio, estroma e endotélio corneano) com o desenvolvimento de uma estrutura de suporte transplantável e biocompatível⁶.

Além das abordagens referidas, dado que a córnea pode ser preservada durante várias semanas, esta é um tecido particularmente adequado para abordagens baseadas em terapia de genes⁴⁰. Esta circunstância garante tempo para a promoção de alteração genética antes da cirurgia, permitindo, assim, minimizar a exposição sistémica a vetores virais. Para além disso, a visualização direta das consequências da transferência de genes é possível uma vez que a córnea é transparente. O endotélio corneano é facilmente acessível, aquando em cultura de órgãos, uma vez que está em contacto direto com o meio de cultura, e, por isso, de fácil manipulação genética⁴⁰. A terapia genética com recurso a vetores virais não é, no entanto, isenta de riscos.

Está bem estabelecido que as células endoteliais de córnea humana retêm a sua capacidade de proliferar *in vitro*, e a sua dinâmica de crescimento é agora melhor compreendida. Embora as culturas primárias não possam ser propagadas indefinidamente, no contexto de enxertos endoteliais corneanos de engenharia de tecidos, a utilização de células não transformadas é vantajosa em relação à utilização de linhas de células endoteliais transfetadas ou imortalizadas cujo crescimento observado é incontroável.

Avanços contínuos e melhorias no sistema de cultura poderão, no futuro, permitir a cultura e a expansão de células endoteliais da córnea do próprio doente, obtida a partir de tecido do endotélio corneano da periferia, que foi relatada como sendo a região mais proliferativa. O transplante de endotélio corneano tem potencial para ser executado, não apenas como um procedimento de transplante alogénico, mas também como um processo de autotransplante, se um pequeno número de células endoteliais forem cultivadas, expandidas, e transplantadas para o endotélio do mesmo doente. Em

medicina regenerativa, se células estaminais pluripotentes puderem ser obtidas a partir de doentes e estas células estaminais forem diferenciadas em células endoteliais da córnea, seria possível o transplante de células endoteliais corneanas autólogas, sem qualquer risco de rejeição, melhorando a taxa de sucesso de transplante a longo prazo^{6,43}. No entanto, é necessário identificar um veículo adequado e que seja também clinicamente viável, de forma a estabelecer um protocolo robusto para validar o sistema de transportador selecionado num modelo *in vivo*. Além disso, o desenvolvimento de um sistema de cultura isento de potenciais xeno-alérgenos será certamente necessário para se proceder à fase de testes clínicos⁶.

Para concluir, as inovações tecnológicas e o avanço na indústria farmacêutica irão melhorar continuamente os procedimentos cirúrgicos e seus resultados. Novas perspectivas de tratamento usando células endoteliais de córnea humanas cultivadas *in vitro* são agora plausíveis e a pesquisa realizada até ao momento tem sido promissora. Na verdade, existe um grande potencial para o avanço no campo do transplante endotelial em direção a uma nova fronteira, através da utilização de células endoteliais de córnea humanas cultivadas⁶.

Técnicas de cultura de células endoteliais

É comumente aceite que o endotélio da córnea humana não regenera *in vivo*. Contudo vários laboratórios demonstraram a capacidade das células de endotélio corneano humano de proliferar *in vitro*^{9,14}. No entanto, os procedimentos envolvidos no isolamento e na cultura primária subsequente destas células variam imensamente entre laboratórios, nos seus protocolos de isolamento, nas matrizes extracelulares utilizadas para auxiliar a fixação das células, nos suplementos utilizados e ainda, nos diferentes meios de cultura usados para a sua expansão⁶.

Nenhum dos dados atuais fornece uma explicação satisfatória do porquê de estas células não se dividirem à semelhança do que ocorre na maioria das células somáticas. Sabe-se também que a inibição de proliferação é mais pronunciada com o aumento da

idade dos dadores¹⁴. Embora esta proliferação deficitária, por si só, não interfira com a fisiologia normal da córnea e com a sua transparência, ela torna-se problemática em estados patológicos, quando as células endoteliais se perdem em massa, como após cirurgias intraoculares ou no armazenamento nos bancos de olhos ⁴⁴.

Joyce *et al.*⁴⁵ sugeriram que o TGF- β 2, pode ser um dos responsáveis por manter as células endoteliais num estado não replicativo na ausência de inibição de contacto. Paull and Whikehart ⁴⁴ também mostraram que as proteínas P53 e Tap63, que são da mesma família, conhecida por regular o ciclo celular, estão presentes em concentrações relativamente elevadas no endotélio corneano central humano, considerado normal, sugerindo que estas proteínas inibem a evolução do ciclo celular da fase G1 para a fase S ^{44,46}. Há também estudos que mostram que a *Rho-associated kinase (ROCK)* está envolvida em processos celulares, tais como a regulação do citoesqueleto, a migração celular, a apoptose celular e, até mesmo, a proliferação celular ⁴⁷. Daí que alguns grupos se tenham dedicado ao estudo da mesma, com recurso, por exemplo, ao Y-27632, um inibidor específico da *ROCK*, que, em modelos de primatas, se mostrou promotor da proliferação celular do endotélio corneano *in vitro* e *in vivo* (em coelhos), quando usado na forma de colírios⁴⁷.

As células de endotélio corneano de dadores mais velhos apresentam capacidade proliferativa, *in vitro*, em resposta a ferimentos, mas quando comparados com células de dadores mais novos, nota-se que demoram mais tempo a progredir no ciclo celular e requerem estimulação mitótica superior^{14,22}. Esta diferença, relacionada com a idade dos dadores, reflete-se nas tentativas de estabelecer uma cultura de células endoteliais corneanas^{14,40}. As células endoteliais adultas são de difícil cultura utilizando técnicas padrão de cultura de tecidos¹. Curiosamente, as células de dadores mais jovens, incluindo os olhos neonatais, são mais fáceis de expandir em cultura ¹. Assim, culturas de células provenientes de embriões humanos, bem como as de dadores de idade inferior a 20 anos, são mais fáceis de estabelecer por longos períodos de tempo do que as de dadores com idades mais avançadas^{24,48}. Atualmente, é possível estabelecer culturas de células de endotélio corneano de dadores de idade avançada, no entanto os resultados têm sido inconsistentes, e, em alguns casos, essas células exibem fenótipo fibroblástico em vez das suas características morfológicas normais *in vivo*⁴⁰.

O isolamento e a cultura primária das células de endotélio corneano humano têm evoluído ao longo de quatro décadas a partir de um método de cultura de explante, para um método de *peeling*, onde as células endoteliais para a cultura são separadas da membrana de Descemet usando uma pinça, método ilustrado na Figura 7^{6,49}. A técnica de explante apresenta algumas limitações, como a contaminação com queratócitos do estroma que têm elevado potencial mitótico, acabando por se sobrepor às células de endotélio corneano^{49,50}.

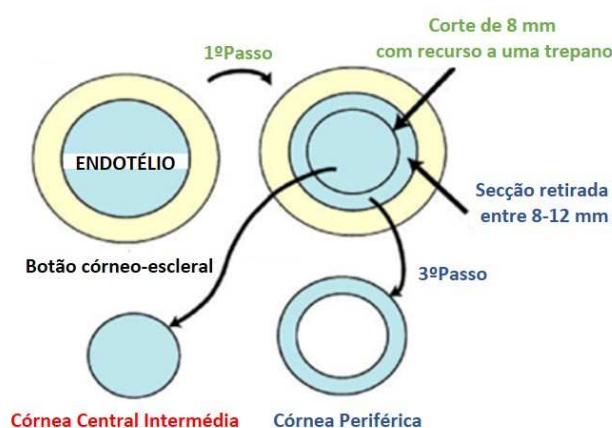


Figura 7: Diagrama demonstrativo da dissecação do endotélio corneano da membrana de Descemet. Imagem adaptada de Whikeheart *et al.*⁴⁴.

Depois da separação do endotélio da membrana de Descemet, o tecido obtido necessita de ser digerido, de modo a isolar as células endoteliais⁷. Os métodos para isolar e cultivar células endoteliais corneanas de humanos têm vindo a ser estabelecidos e melhorados ao longo dos anos. Essas melhorias têm a ver com a tentativa de especificar um meio de cultura assim como a sua suplementação de forma a poder definir um protocolo ideal e condições de cultura perfeitas para a expansão destas células⁵¹. Muitas das condições de cultura estudadas estão revistas na Tabela 1. Muitos fatores de crescimento foram já testados e demonstrada a sua capacidade de aumentar a proliferação de culturas de células endoteliais de córneas humanas, incluindo o bFGF (fator de crescimento fibroblástico, do inglês, *basic fibroblastic growth factor*), assim

como o EGF (fator de crescimento epidérmico, do inglês, *epidermal growth factor*), e o suplemento de crescimento de células endoteliais.

Tabela 1. Meios e suplementos testados no estabelecimento de culturas primárias de células de endotélio corneano.

Meio	Soro	Fatores de crescimento e suplementos	Referência
MEM	10% Calf Serum	Insulina, transferrina, selenite	Blake <i>et al.</i> ¹⁷
MEM	10% FBS, 5% Calf Serum	Glutamina, aminoácidos essenciais e não essenciais	Yue <i>et al.</i>
DMEM	10% FBS, 5% Calf Serum	L-glutamina, bFGF, doxiciclina	Mimura <i>et al.</i> ⁵²
F99, Ham's F12 e M199	2-5% NBS	Ácido ascórbico, insulina, bFGF	Joyce and Friedl ⁴⁸
DMEM	Sem soro	bFGF, estreptomicina	Okomura <i>et al.</i> ⁴⁷
EGM-2, Meio de crescimento endotelial	5% FBS	Ácido ascórbico, bFGF, EGF	Li <i>et al.</i> ⁷
DMEM-F12	15% BSA	bFGF, EGF, insulina, transferrina, selenite	Yokoo <i>et al.</i> ⁵³

O crescimento e a adesão celulares também têm sido estimuladas através de matrizes artificiais, sobre as quais se estabelecem as culturas, como a condroitina e a

laminina ou até mesmo sobre matrizes extracelulares secretadas por células endoteliais corneanas de bovinos²⁴. Os métodos de digestão do tecido passaram essencialmente por três tipos de enzimas, como se pode observar na Tabela 2.

Tabela 2. Enzimas utilizadas na digestão de endotélio da córnea para o estabelecimento de culturas primárias

<i>Tipo de enzimas</i>	<i>Taxa de Sucesso</i>	<i>Referência</i>
Colagenase IV	Elevada	Liu <i>et al.</i> ²²
Dispase	Alguns relatos de ineficácia ⁷	Ishino <i>et al.</i> ¹⁵
Tripsina/EDTA	Deve ser combinada com a colagenase ²² , pode causar danos nas células ⁵⁴	Joyce <i>et al.</i> ⁵⁵

No entanto, a indução da proliferação destas células não é a única dificuldade. A contaminação com fibroblastos do estroma, assim como a transformação mesenquimatosa das células endoteliais são outras situações que comprometem a cultura⁵⁶. Assim, é fundamental a caracterização das culturas primárias obtidas recorrendo a marcadores celulares.

Com o conhecimento da existência de nichos de células estaminais na periferia do endotélio corneano surgiram novas técnicas que preveem o recurso a essas células estaminais para formar esferas de células precursoras em suspensão, que quando colocadas em cultura aderente serão capazes de dar origem a culturas de células diferenciadas em células de endotélio^{53,57}.

Células estaminais endoteliais

As células estaminais apresentam a capacidade de se perpetuar pelas suas características de autorrenovação e gerar novas células maduras de um determinado tecido pela sua capacidade de diferenciação. Caracterizadas pela sua capacidade ilimitada de proliferar e pela sua grande plasticidade, estas células atuam como sistema de manutenção e reconstituição dos tecidos. O estímulo mitogénico para estas células pode dar origem a uma divisão simétrica, em que as duas células filhas são idênticas, ou originar uma divisão assimétrica, na qual uma das células filhas é semelhante à progenitora, mantendo o *pool* de células estaminais, e a outra, com características diferentes que dará origem a uma célula diferenciada⁵⁸⁻⁶⁰.

As células estaminais podem ser totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes. As células totipotentes podem dar origem a qualquer tipo de célula humana e dar origem a um ser vivo, como os gametas. As células pluripotentes são capazes de dar origem a células de todas as três camadas germinais, ectoderme, mesoderme e endoderme, não tendo, no entanto, aptidão para originar um ser vivo. As células estaminais multipotentes têm menor plasticidade e maior grau de diferenciação dando origem a múltiplos tipos de células dentro de um determinado órgão. Finalmente, as células unipotentes são as que originam um único tipo de tecido⁶¹.

Estas células foram classificadas em quatro tipos de acordo com a sua origem. Foi possível isolar células estaminais a partir de embriões pré-implantação, de fetos, de adultos e do cordão umbilical. Assim, estas podem ser classificadas em células estaminais embrionárias, em células estaminais fetais, em células estaminais adultas e em células estaminais do cordão umbilical⁵⁸⁻⁶⁰.

A investigação das células estaminais tem tido um desenvolvimento rápido nos últimos anos, com grande impacto no aumento de conhecimentos de biologia celular e levando à emergência de novos tratamentos celulares em diversas áreas da medicina. O progresso na pesquisa de células estaminais oferece uma nova esperança para o tratamento de várias doenças antes incuráveis³.

As células estaminais caracterizam-se pela sua pluripotência, pelas suas divisões simétricas e assimétricas, pela quiescência, pela sua capacidade de autorrenovação, pela dependência de nichos e repovoação de tecidos⁶². Em particular a sua capacidade ilimitada de autorrenovação e a possibilidade de diferenciação em qualquer tipo celular são características que lhes conferem grandes potencialidades³. Acredita-se que as células estaminais adultas têm vantagens éticas e imunológicas em relação às células estaminais embrionárias como uma opção terapêutica futura³.

Existem relatos de que as células do endotélio da córnea são capazes de se renovar através de uma provisão de células tipo células estaminais existentes à periferia, no limbo posterior^{5,44,50}. A linha de *Schwalbe* é a estrutura que tem sido apontada como nicho ou depósito destas células^{5,63}. Esta teoria foi recentemente suportada por dados quantitativos obtidos por Amann *et al.*, nos quais se observa uma percentagem de aproximadamente 10% de aumento de densidade celular nas zonas periféricas do endotélio corneano humano, particularmente na região superior. Por sua vez, Bednarz *et al.* demonstraram que algumas das células endoteliais humanas marcam positivamente com *BrdU*, indicando a síntese de novo ADN, que antecede a divisão celular^{27,44}. Estas células parecem ser imunorreativas à enolase específica dos neurónios, sugerindo que podem ter função neuro-regulatória³. As evidências sugerem, pois, a migração das células desta área para a periferia e até para as zonas danificadas do mesmo^{5,44,63}. Esta hipótese é suportada pela marcação positiva de marcadores específicos de células estaminais, como a nestina a telomerase, a P63, colagénio 1 *alpha* 1 e a fosfatase alcalina^{5,10,44,50,63,64}. A existência destes nichos é extremamente relevante para a cultura de células endoteliais corneanas, uma vez que estas células estaminais podem ser estimuladas a diferenciar-se em células endoteliais, e também para o estudo de intervenções terapêuticas, não cirúrgicas, que visem essa mesma diferenciação *in vivo* através do uso de colírios.

Marcadores celulares

Uma vez estabelecidas as culturas de células de endotélio corneano, inúmeros grupos de investigação usam a técnica de imunocitoquímica de modo a identificarem as células dessas mesmas culturas, bem como o seu estado de maturação. São marcadores de células endoteliais a Na^+/K^+ ATPase, a *zonula occludens 1*, e a Cox IV (oxidase IV do citocromo C, do inglês, *cytochrome C oxidase IV*)^{10,65}

A *zonula occludens-1* (ZO-1) é uma proteína associada das *tight junctions*, complexos membranares que asseguram a permeabilidade seletiva a nutrientes, que estão expressas na membrana lateral das células de endotélio corneano^{2,24,65}. A Na^+/K^+ ATPase é outra proteína característica das células de endotélio corneano, funcionando como bomba iónica^{66,67}. A Cox IV é uma proteína das mitocôndrias que tem sido avaliada no endotélio como marcador de diferenciação¹⁰.

São várias as proteínas marcadoras de células imaturas ou estaminais que têm sido citadas no estudo do endotélio da córnea, destacando-se a nestina, o colagénio $1\alpha 1$, a tubulina- $\beta 3$ e a telomerase^{20,50}. A nestina e a tubulina- $\beta 3$ são proteínas marcadoras de células imaturas, com origem neural, importantes quanto à classificação do estado de maturação celular. Estas proteínas têm sido avaliadas principalmente em estudos em que se recorreu ao protocolo de cultura de esferas, que se baseiam na existência de nichos de células estaminais na periferia do endotélio corneano^{20,53}. O colagénio $1\alpha 1$ (COL1 $\alpha 1$) é considerado um marcador de superfície de células estaminais com origem na crista neural⁵⁰. A telomerase é uma ribonucleoproteína que mantém o comprimento dos telómeros acrescentando repetições G às suas extremidades⁶⁵. O estudo da presença da telomerase no endotélio foi efetuado com o objectivo de perceber se o estado não replicativo das células de endotélio era causado pelo encurtamento dos telómeros na replicação inicial destas células^{22,65}.

Modelos Animais

A viabilidade de transplantes de culturas de células endoteliais da córnea, humanas ou animais, já foi testada em alguns modelos animais. Gospodarowicz *et al.* mostraram que culturas de células endoteliais de córneas bovinas, colocadas sobre membranas de Descemet oriundas de gatos e posteriormente transplantadas em gatos, formaram uma monocamada de elevada complexidade e organização *in vivo* em, apenas, oito dias e mantiveram a transparência corneana por pelo menos dez meses⁶⁸.

Jumblatt *et al.* demonstraram que culturas de células endoteliais de coelhos tendo córneas como recetoras dessas células e, posteriormente, transplantadas em coelhos hospedeiros mantinham a transparência corneana quando as células dos dadores estavam menos de um mês em cultura antes de transplante⁸. No entanto as células endoteliais corneanas dos coelhos têm elevada capacidade proliferativa, contrariamente às humanas, o que pode ter influenciado as conclusões⁶⁹.

Insler e Lopez estabeleceram culturas de células endoteliais neonatais humanas sobre membranas de Descemet provenientes de córneas de banco de olhos e transplantaram-as em *Chlorocebus aethiops*⁸. Setenta e cinco por cento destas córneas mantiveram transparência por, pelo menos, doze meses. As células transplantadas mantiveram a sua viabilidade, as suas características morfológicas e a função de bomba após o transplante. Estudos do laboratório Engelmann relatam a cultura e o transplante de células de endotélio de córneas humanas de dadores adultos, demonstrando a viabilidade do transplante de células cultivadas a partir de dadores mais velhos. Para tal desenvolveram um modelo com córneas recetoras cujo endotélio foi retirado e substituído por endotélio expandido *in vitro*. No entanto, o endotélio transplantado nestes estudos exibiu morfologia e densidade celular variáveis²⁴.

Okomura *et al.* realizaram o primeiro estudo de viabilidade do transplante de endotélio corneano cultivado numa matriz de colagénio em modelos primatas cujas células endoteliais corneanas têm baixo poder proliferativo, à semelhança do humano. Neste estudo desenvolveram uma monocamada celular de endotélio corneano de primata numa matriz de colagénio I, que foi transplantada em olhos de primata com disfunção

endotelial, através de injeção de ar. Os resultados obtidos mostraram a recuperação da transparência da córnea sem progressão para edema ou neovascularização⁶⁹.

O resultado dos estudos em modelos animais são de extrema importância no estudo da disfunção endotelial corneana e constituem um passo importante em direção a ensaios clínicos que precedem a sua aprovação para uso humano.

Capítulo II - Objetivos

O endotélio é a camada mais importante da córnea. Este permite-lhe transparência através da regulação dos seus fluxos iónicos e bomba Na^+/K^+ ATPase, mantendo o equilíbrio hídrico e iónico. Composto por células de características únicas e sem capacidade de divisão *in vivo*, a perda celular acentuada provoca danos irreversíveis, conferindo ao tecido corneano uma opacidade crescente, impedindo assim o seu perfeito funcionamento e podendo culminar em cegueira corneana.

Com vista a, no futuro, contribuir para o desenvolvimento de um método simples e reprodutível de obtenção de culturas primárias de endotélio, de modo a perspetivar novas terapias, abordagens em medicina regenerativa ou intervenções como o autotransplante, por exemplo, este trabalho experimental teve como objetivo a otimização de um protocolo para estabelecer culturas primárias de endotélio da córnea. Numa segunda etapa pretendeu-se ainda caracterizar as culturas primárias obtidas através de marcadores celulares já estabelecidos.

Capítulo III - Materiais

No presente capítulo são descritos os materiais utilizados, nomeadamente, o material biológico, os reagentes e os consumíveis.

Material biológico

Para a realização deste trabalho foi necessária a utilização de material biológico, nomeadamente, de córneas humanas e de córneas de rato.

As córneas humanas foram gentilmente cedidas pelo Banco de Olhos do Centro de Responsabilidade Integrado em Oftalmologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra EPE. Estas córneas correspondem a material descartado pelo Banco de Olhos por apresentarem baixa contagem celular ou por terem ultrapassado o tempo máximo de preservação, condições que impedem a sua utilização em transplante. Para a contagem das células endoteliais da córnea, são efetuadas duas avaliações com intervalo de 48 horas e, se em alguma das contagens o número de células for inferior a 1800 células/mm², a córnea deixa de ser considerada viável para transplante podendo ser cedida para o nosso estudo. Do mesmo modo, as córneas só são passíveis de ser utilizadas em transplante de córneas, quando preservadas no Banco de Olhos até um máximo de 15 dias.

A colheita de endotélio corneano humano tem lugar em bloco operatório e, portanto, em ambiente estéril. As córneas cedidas estão preservadas em Eusol-C® (Alchimia, Itália). Aquando da colheita de endotélio, com recurso a um microscópio oftalmológico, a córnea é colocada com o epitélio para baixo, como se pode observar na Figura 8, e o excesso de meio de preservação bem como o pigmento que possa existir é limpo com bastonetes de algodão. Posteriormente, e com a ajuda de um gancho *Sinsky* e de uma pinça, o endotélio é separado das restantes camadas através de *peeling*. O endotélio é cortado em pequenos pedaços, colocado num tubo de *falcon* com meio de cultura e devidamente acondicionado em caixa apropriada para realizar o transporte para o Laboratório de Culturas Primárias da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

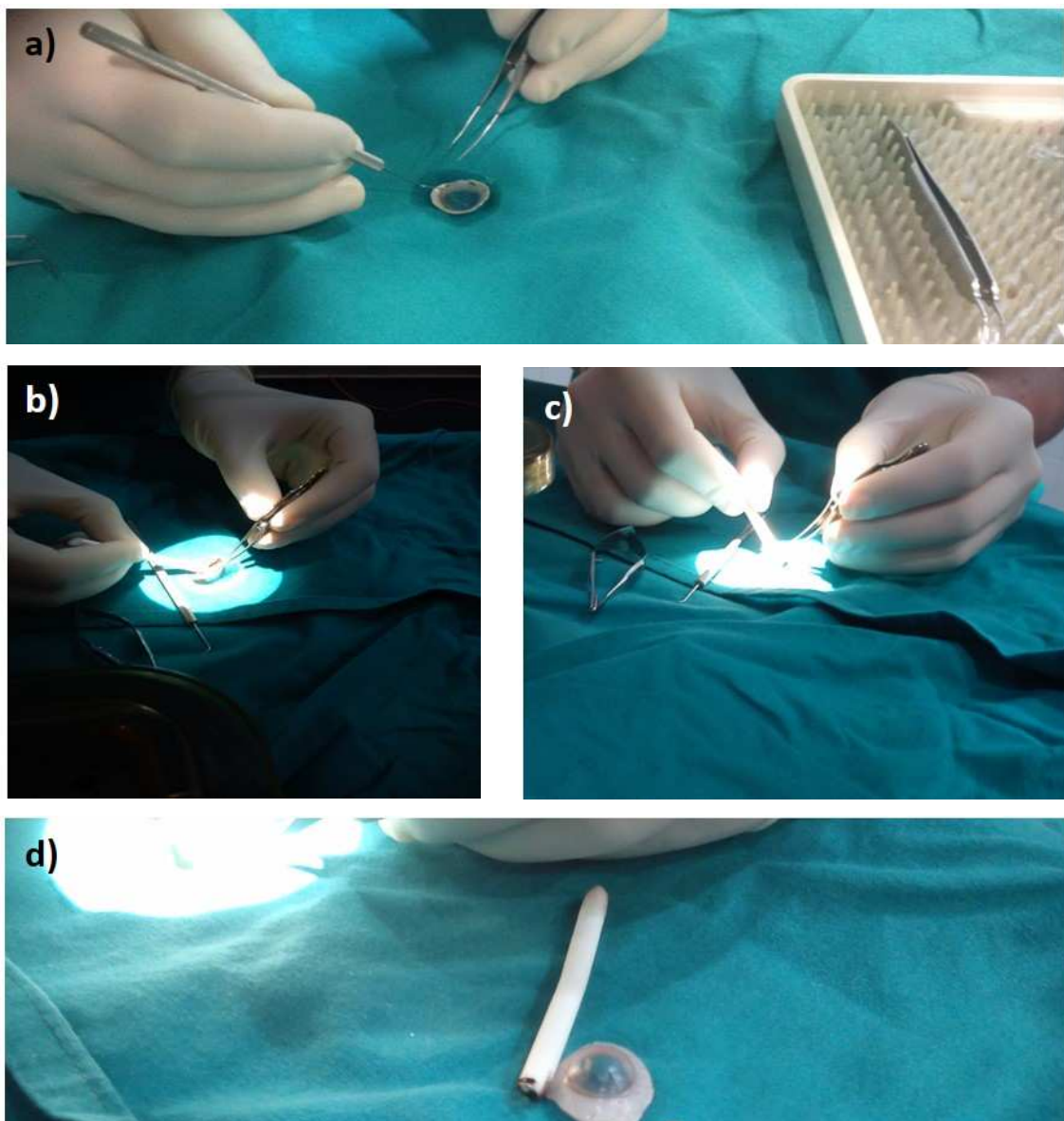


Figura 8: Colheita de endotélio corneano humano. a) A fase de separação do endotélio com recurso ao gancho Sinsky. b) e c) O peeling do endotélio separando-o das restantes camadas. d) A córnea no fim do procedimento ao lado de um bastonete.

Obtiveram-se 21 córneas, das quais três foram descartadas por mau acondicionamento. Das restantes, 14 amostras continham endotélio de uma córnea e duas amostras continham o material das duas córneas do mesmo dador, numa tentativa de aumentar o sucesso da cultura posterior. A média de contagens celulares das amostras foi de 1877 ± 274 , com um mínimo de 1361 e um máximo de 2237 células/mm².

Pela escassez de córneas humanas disponíveis para a realização deste trabalho e dada a premência em testar numerosos parâmetros de cultura, foram, paralelamente, realizados estudos com endotélio colhido de córneas de ratos Wistar. Com o propósito de fazer prevalecer a regra dos três Rs em experimentação animal, optou-se por utilizar globos oculares de animais ocisados no âmbito de outros trabalhos de investigação, cuja intervenção, previsivelmente não afetasse o endotélio da córnea. A colheita do endotélio dos ratos foi efetuada em condições assépticas. Após a ocisão, procedeu-se à enucleação dos globos oculares com recurso a uma tesoura cirúrgica e uma pinça devidamente esterilizadas cuja preparação se encontra representada na Figura 9. Os globos oculares foram submetidos a lavagens com PBS (tampão salino de fosfato, do inglês, *phosphate saline buffer*; constituído por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de NaH_2PO_4 (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH_2PO_4 (Sigma, P0662), com pH ajustado a 7,4) e em PBS com 1% de antibiótico (100 U/ml de penicilina e 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomicina; Sigma A5955).

Seguidamente, e sobre campos estéreis, os globos oculares foram cortados separando a córnea dos restantes constituintes. Sob microscópio oftalmológico, as córneas foram colocadas com a parte epitelial virada para baixo e fixadas a uma superfície rígida com agulhas. Após a correta fixação o endotélio foi separado das restantes camadas da córnea com recurso a pinças e a agulhas estéreis. As culturas realizadas perfizeram um total de 41. Como o conteúdo endotelial de rato é bastante menor que o humano, optou-se por agrupar vários endotélios por cada amostra. As amostras foram colocadas em placas de cultura com meio de cultura apropriado e transportadas para o Laboratório de Culturas Primárias da Unidade de Biofísica da FMUC.



Figura 9: Colheita de Endotélio de ratos Wistar. a) Os globos oculares ocidados. b) O material usado no procedimento. c) Uma córnea.

Meio de Cultura e Digestão Enzimática

O meio de cultura usado para transportar o material biológico e nutrir as culturas primárias foi DMEM-F12 (do inglês, *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (Sigma, D5648) e *Ham's F12 Nutrient Mixture* (Sigma, N6760); 1:1), suplementado com o 1% de complexo de insulina, de transferrina e de selenite (Gibco, 51300-044), 60 μ M de putrescina (Sigma, P5780), 20 nM de progesterona (Sigma, P8783) e 1% de antibiótico (Gibco, 15240) ⁵³.

Este meio de cultura foi também utilizado para a digestão enzimática dos tecidos, sendo nesse caso adicionada collagenase tipo 1A (Affymetrix USB, 13820). As enzimas dispase (Stemcell, 07913) e tripsina/EDTA (Gibco, 25200) foram utilizadas conforme fornecidas. A collagenase tipo 1 é conhecida por se ligar ao colagénio nativo⁷⁰. A dispase cliva a fibronectina e o colagénio do tipo IV⁷¹. A tripsina cliva os peptídeos no lado do terminal C dos resíduos de aminoácidos de lisina e de arginina. A taxa de hidrólise é mais lenta se um resíduo ácido estiver em ambos os lados do local de clivagem e não ocorre clivagem se no lado carboxilo do local de clivagem estiver um resíduo de prolina⁷².

O meio de cultura foi também suplementado com fatores de crescimento a cada 96 horas. Foram usados o fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*, (Sigma, E9644)) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF, do inglês, *basic fibroblast growth factor* (Sigma, F0291)).

Para o estabelecimento de algumas culturas primárias o meio de cultura foi ainda suplementado com 15% de soro bovino fetal (FBS, do inglês, *fetal bovine serum*, (Gibco, 10270) ou com 15% albumina sérica de bovino (BSA, do inglês, *bovine serum albumin* (NZYTech, MB04602).

Revestimento de Placas de Cultura

Para a realização deste trabalho foram utilizadas placas de cultura do tipo *multiwell* (VWR) com poços de diversos diâmetros. Estas placas foram utilizadas conforme adquiridas ou após serem submetidas a revestimento da área de crescimento. A digestão dos tecidos foi efetuada em placas de 24 poços revestidas com poli(2 hidroxietilmetacrilato), polyHEMA (Sigma, P3932). Para o estabelecimento e a propagação das culturas primárias, e dependendo do protocolo adotado, utilizaram-se placas revestidas com polyHEMA, poli-L-lisina (Sigma, P6407), colagénio A (Biochrom AG, L7220) e sem revestimento.

O revestimento das placas foi sempre realizado no Laboratório de Culturas Primá-

rias, na câmara de fluxo laminar (Heraus Holten, HB2448, 1998), de forma a garantir um ambiente estéril.

Para o revestimento de polyHEMA, o composto sólido foi diluído na concentração de 12 mg/ml em álcool absoluto sobre placa de aquecimento com agitação magnética⁷³. A solução obtida foi distribuída, num volume de 300 µl por cada poço das placas *multiwells* de 24 poços. Estas foram depois secas durante 4 a 5 dias a uma temperatura de 37° em estufa apropriada (Trade Raypa, EV50).

Para o revestimento com poli-L-lisina, o composto foi solubilizado na concentração de 1 mg/ml em água ultra-pura previamente autoclavada. Para as placas de 24 poços foram usados 200 µl por poço, sendo adaptado este volume para as placas de poços de maior área. Deixou-se secar durante 5 minutos, após os quais o excesso de poli-L-lisina foi aspirado. Cada poço foi lavado com água ultra-pura e seco *overnight* em ambiente estéril.

O revestimento com colagénio A foi preparado por diluição em PBS autoclavado numa concentração de 1 mg/ml. Para as placas de 24 poços, foram distribuídos 300 µl de solução por cada poço, sendo adaptado este volume para as placas de maior área. As placas revestidas foram incubadas a 37°, numa atmosfera de CO₂ a 5% durante 30 minutos. De seguida o excesso foi removido e efetuadas 2 lavagens com PBS.

Capítulo IV - Estabelecimento de Culturas Primárias

Com o propósito de otimizar o protocolo de estabelecimento e de manutenção de culturas primárias de endotélio corneano foram testados vários procedimentos, considerando a bibliografia disponível, os quais foram modificados conforme os resultados obtidos.

As primeiras experiências foram realizadas considerando e adaptando o procedimento descrito por Yokoo *et al.* 2005 ⁵³, que assenta no estabelecimento das culturas primárias através do isolamento de colónias esféricas em suspensão. A escolha deste protocolo prendeu-se com o conhecimento da existência de nichos de células estaminais na periferia do endotélio corneano ⁴⁴, bem como o sucesso reportado pelo grupo e o detalhe com que o protocolo foi descrito.

Protocolo I

Após a recolha do tecido no Banco de Olhos, procedeu-se à sua digestão em meio de cultura enriquecido com collagenase a 0,02%. As amostras foram mantidas neste meio (1 ml/poço) *overnight* em placas revestidas com polyHEMA ⁴ em incubadora (Heraeus, Hera Cell 150, 2006) com atmosfera húmida, com 5 % CO₂, à temperatura de 37°C. Após este período de aproximadamente 16 horas, o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos de *Eppendorf*, devidamente identificados. Os tubos foram centrifugados a 200 G durante 8 minutos de modo a concentrar as células e descartar o meio de digestão. O *pellet* obtido foi sujeito a nova digestão, desta feita em solução de tripsina/EDTA a 0,05% durante 10 minutos à temperatura de 37°.

O material biológico foi novamente centrifugado a 200 G durante 8 minutos de forma a separa-lo da tripsina. O *pellet* obtido foi ressuspenso em meio de cultura enriquecido com 1% de metilcelulose (Sigma, M0387), suplementado com 40 ng/ml de bFGF e 20 ng/ml de EGF e transferido para uma placa de cultura revestida com polyHEMA. O revestimento da placa e a adição de metilcelulose ao meio visaram o estabelecimento de uma cultura em suspensão e, assim, a obtenção de colónias esféricas ⁴. A suplementação com bFGF e com EGF foi efetuada a cada quatro dias e as

culturas foram mantidas por dez dias, ao longo dos quais foram monitorizadas diariamente com registo fotográfico dos aspetos considerados relevantes.

Este protocolo foi realizado em endotélio corneano humano com $n=2$.

Resultados

Como resultado do protocolo I, foi possível observar a presença de grandes fragmentos de tecido praticamente intacto, cuja imagem exemplificativa está patente na Figura 10. Ao longo dos 10 dias de monitorização não foi possível a observação de colónias esféricas ou de células individuais. Este facto pareceu dever-se, pois, à digestão enzimática ineficaz.

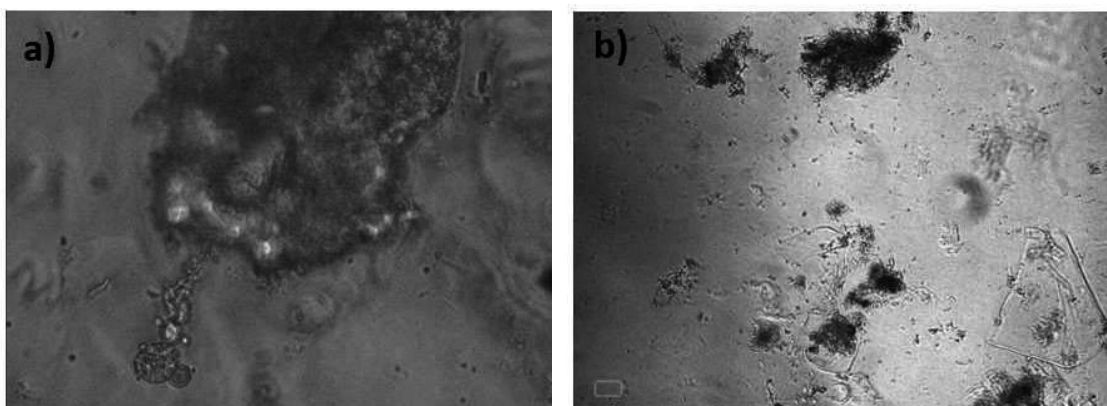


Figura 10: Resultado do Protocolo I. a) É possível observar na imagem, obtida no segundo dia de cultura, um pedaço de tecido não digerido. b) Podem-se observar vários pedaços de tecido não digerido; imagem obtida ao terceiro dia de cultura. Ambas as imagens foram adquiridas com uma ampliação de 100x.

Protocolo II

Perante a ineficácia do Protocolo I, foi necessária a otimização do processo de digestão. Assim, o Protocolo II foi realizado de acordo com a metodologia seguidamente descrita.

Após a recolha do tecido, optou-se por prolongar a digestão enzimática com colagenase a 0,02% para um período de 24 horas, em placas revestidas com polyHEMA, em incubadora com atmosfera húmida, com 5 % CO₂, á temperatura de 37°C. Seguidamente o tecido foi transferido, juntamente com o meio de digestão para *ependorfs* e centrifugado a 200 G durante 8 minutos de modo a concentrar as células e descartar o meio. O *pellet* obtido foi sujeito a uma segunda digestão enzimática, neste caso com tripsina/EDTA a 0,25% durante 10 minutos em incubadora à temperatura de 37°C, 5% CO₂. Após a lavagem e centrifugação (200 G durante 8 minutos) o *pellet* obtido foi colocado em meio de cultura enriquecido com 1% de metilcelulose, suplementado com 40 ng/ml de bFGF e 20 ng/ml de EGF. A cultura iniciada foi mantida num poço de uma placa de 24 poços revestida com polyHEMA. A suplementação com bFGF (40ng/ml) e com EGF (20ng/ml) foi efetuada a cada quatro dias. As culturas foram monitorizadas diariamente com registo fotográfico dos aspetos relevantes ao longo de 10 dias.

Para este protocolo foram usadas 9 córneas humanas e 12 córneas de ratos *Wistar*. Os endotélios colhidos das córneas de rato foram tratados em grupos de 6, o que significa que foi possível iniciar a cultura de 2 amostras.

Resultados

As modificações introduzidas no protocolo de digestão enzimática permitiram a formação de esferas após três dias de cultura do material biológico humano, como se pode constatar na Figura 11. Por outro lado, na mesma imagem pode verificar-se que, ainda assim, a digestão do endotélio continuou a demonstrar eficácia abaixo da

pretendida, pela presença de pedaços de tecido por digerir. No que respeita às esferas observadas, estas perderam a sua viabilidade e acabaram mesmo por se perder antes do término dos dez dias em cultura.

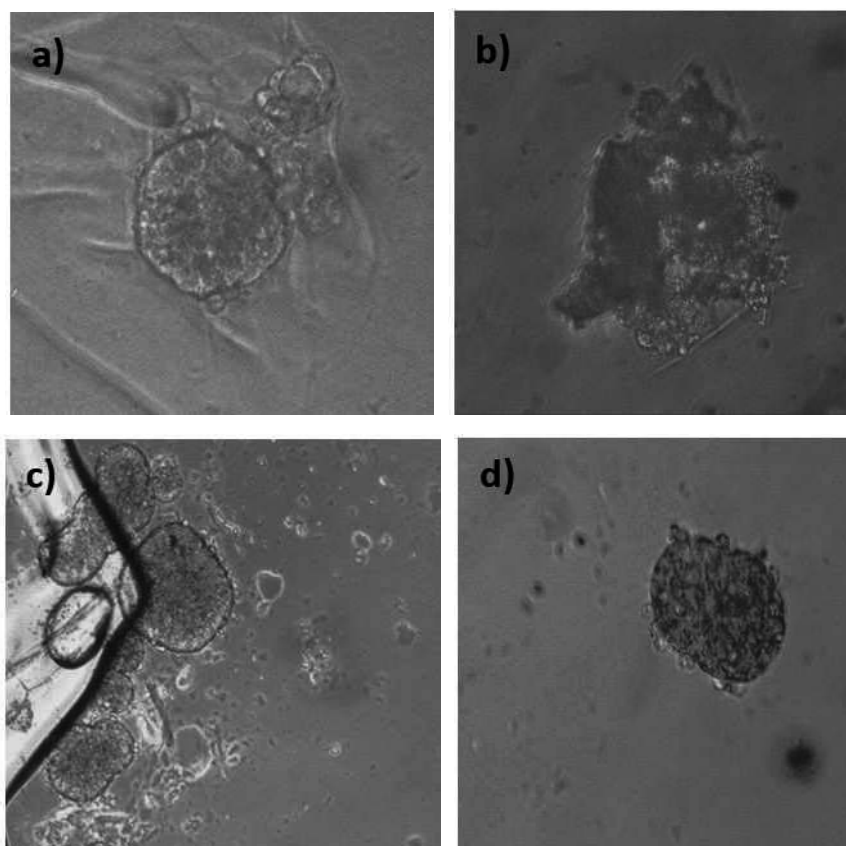


Figura 11: Imagens resultantes do registo fotográfico do protocolo II realizado em córneas humanas. a) Na imagem pode observar-se uma esfera. b) Na imagem pode observar-se um pedaço de tecido não digerido. Ambas as imagens foram obtidas ao terceiro dia de cultura com uma ampliação de 100x. c) e d) Imagens de esferas obtidas ao quinto dia de cultura, ampliação de 100x.

No que respeita às culturas primárias obtidas a partir de endotélio da córnea de ratos Wistar, foi possível observar a formação de esferas ao quinto dia de cultura, como suportado pelas imagens da Figura 12, no entanto a eficácia da digestão também ficou aquém do desejado. A viabilidade celular não se manteve ao longo dos dez dias de cultura, acabando por se perder nesse intervalo temporal.

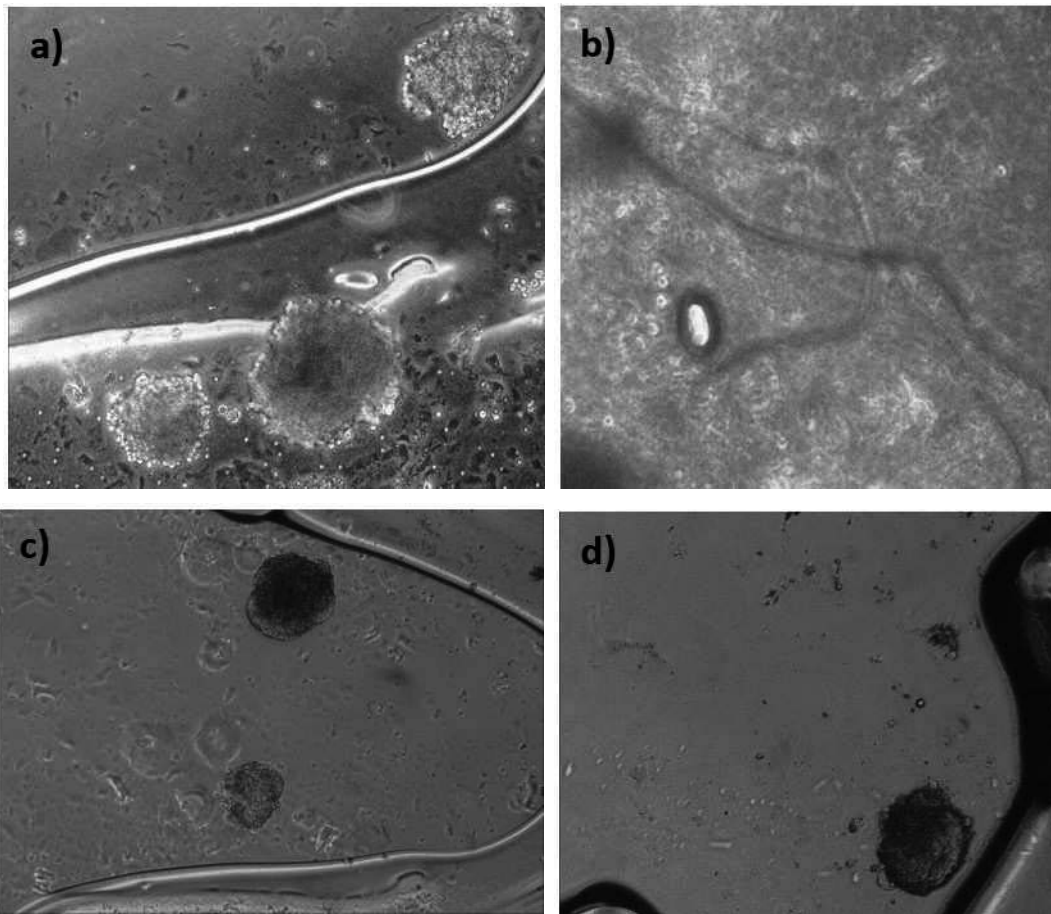


Figura 12: Imagens do registo fotográfico do protocolo II realizado em córneas de rato Wistar. a) Na imagem pode observar-se várias esferas. b) Na imagem pode observar-se um pedaço de tecido não digerido. Imagens obtidas ao quinto dia de cultura. c) e d) as imagens mostram as esferas ao sétimo dia em cultura. Todas as imagens foram obtidas com uma ampliação de 100x.

Protocolo III

Uma vez que o resultado da digestão do material biológico após os protocolos I e II não foi ótimo, foi tentada uma abordagem diferente. Considerando o trabalho de Ishino *et al.*, testou-se também o processo de digestão através de dispase durante 40 minutos¹⁵, uma vez que esta enzima estava disponível e que este período de incubação tornaria o procedimento mais simples e conveniente.

Assim, após a recolha dos tecidos, estes foram incubados durante 40 minutos em meio de cultura suplementado com dispase na concentração de 1 U/ml, em placas revestidas com polyHEMA, em incubadora com atmosfera húmida de 5% CO₂ à temperatura de 37°.

O conteúdo dos poços foi transferido para *Eppendorfs* e centrifugado a 200 G por 8 minutos, de modo a concentrar as células e descartar a dispase. O *pellet* foi então colocado em meio de cultura enriquecido com 1% de metilcelulose, com vista à formação de esferas. O meio de cultura foi suplementado com 40 ng/ml de bFGF e com 20 ng/ml de EGF a cada 4 dias, ao longo de 10 dias. O registo fotográfico das zonas de interesse foi mantido numa base diária.

Este procedimento foi efetuado em córneas de ratos *Wistar*, sendo utilizadas 30 córneas que foram divididas de modo a constituir 5 amostras para culturas primárias.

Resultados

Durante o tempo de cultura (10 dias) não foi visível qualquer indício de possível desenvolvimento de cultura celular. O tecido presente nos poços aparentou não ter sido digerido de forma eficaz, levando à conclusão de que o novo método de digestão também foi ineficaz, sendo assim descartado. Este resultado é corroborado pelas imagens obtidas, apresentadas na Figura 13.

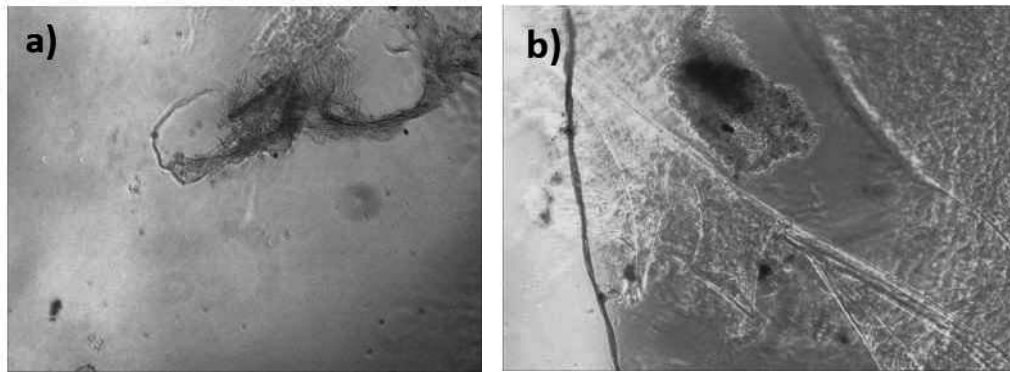


Figura 13: Imagens obtidas como resultado da digestão de material de rato Wistar com recurso a dispase. a) e b) Pode observar-se um pedaço de tecido não digerido. A imagem a) foi obtida ao quarto dia em cultura e a imagem b) foi obtida ao sexto dia, ambas com uma ampliação de 100x.

Protocolo IV

Considerando os resultados obtidos até aqui, recuperou-se assim o protocolo de digestão enzimática com collagenase. Assim, o material biológico foi submetido à digestão em meio de cultura suplementado com collagenase I, agora numa concentração superior de 0,04 %, mantendo-se o tempo de digestão de 24 horas em placas revestidas com polyHEMA mantidas em incubadora a 37°C. Após este período o conteúdo dos poços foi colocado em *Eppendorfs* e centrifugado a 200 G durante 8 minutos e o *pellet* colocado em tripsina/EDTA na concentração de 0,25 % durante 10 minutos.

Para o estabelecimento da cultura de colónias esféricas em suspensão, o material digerido foi centrifugado, com uma força de 200 G durante 8 minutos, e o *pellet* foi suspenso em meio de cultura enriquecido com 1 % de metilcelulose. Do mesmo modo a suplementação com 40 ng/ml de bFGF e com 20 ng/ml de EGF foi realizada de quatro em quatro dias durante os 10 dias de monitorização. As culturas foram observadas diariamente e efetuado o registo fotográfico das áreas de interesse.

Este procedimento foi realizado em duas córneas humanas que se traduziram em duas culturas primárias e também em 24 córneas de ratos *Wistar*, tendo sido possível estabelecer três amostras para cultura primária.

Resultados

O material biológico de origem humana não apresentou esferas durante os dez dias de cultura. O registro fotográfico, apresentado na Figura 14, mostra a formação de esferas ao quarto dia em cultura, de origem em endotélio de ratos Wistar. No entanto, não foi possível manter estas colônias durante os dez dias, acabando por se perder o material. Assumiu-se assim que o processo de digestão era o ideal, procedendo, então, à otimização do protocolo que permite a manutenção do material em cultura.

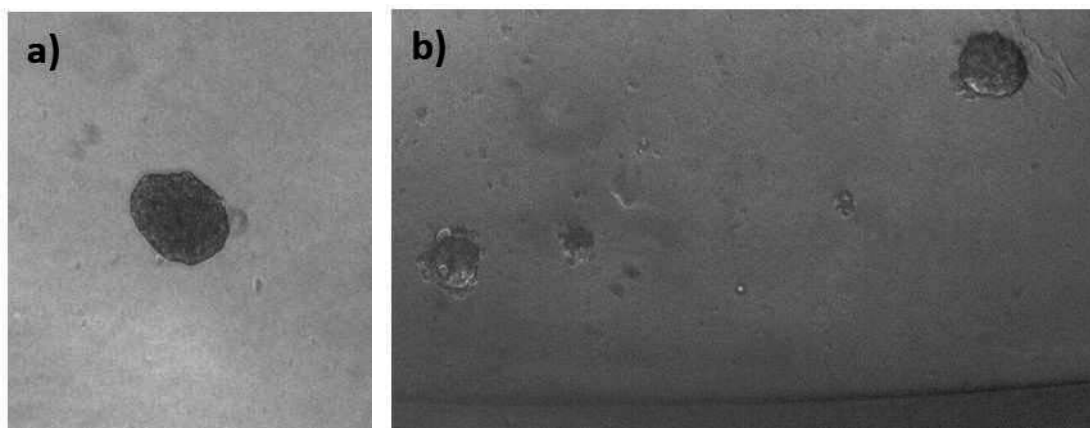


Figura 14: Imagens obtidas no seguimento do protocolo IV. a) Na imagem pode observar-se uma esfera. b) Na imagem podem observar-se 2 esferas. Imagens obtidas com ampliação de 100x.

Protocolo V e Protocolo VI

Considerando as dificuldades em manter as culturas de colônias esféricas em suspensão com viabilidade optou-se por colocar o tecido digerido de imediato em cultura aderente.

Assim, o material biológico obtido foi digerido, conforme descrito no protocolo IV, ou seja, em meio de cultura com 0,04 % de colagenase, durante 24 horas em placas

revestidas com polyHEMA mantidas em incubadora a 37°C. O conteúdo foi centrifugado, com força de 200 G durante 8 minutos, e o *pellet* foi colocado em tripsina/EDTA com concentração de 0,25% durante 10 minutos.

O material foi ressuspenso em meio de cultura, sem metilcelulose, e colocado numa placa de 24 poços revestida conforme descrito na Tabela 3. O meio foi suplementado com BSA a 15 %⁵⁰, 40 ng/ml de bFGF e 20 ng/ml de EGF. O objetivo do uso de BSA foi aumentar a capacidade proliferativa das células, permitindo que estas se expandissem mais facilmente, tentando evitar o FBS ⁶⁸. A concentração dos fatores de crescimento foi reposta de 4 em 4 dias. A monitorização e o registo fotográfico foram efetuados diariamente.

Tabela 3: Revestimento da área de crescimento das placas usado no Protocolo V e no Protocolo IV.

	<i>Revestimento</i>
<i>Protocolo V</i>	Poli-L-lisina ⁷⁴
<i>Protocolo VI</i>	Colagénio ²²

Cada protocolo foi realizado em 8 córneas de ratos *Wistar* tendo sido possível iniciar apenas uma cultura de cada situação.

Resultados

Tanto com o Protocolo V como com o Protocolo VI não houve formação de qualquer monocamada celular que pudesse ser expandida em cultura. Ao fim de aproximadamente 20 dias de monitorização o material foi descartado. Os resultados do Protocolo V e do Protocolo IV em conjunto permitiram concluir que a BSA não estimulou de forma eficaz a proliferação celular.

Protocolo VII, Protocolo VIII e Protocolo IX

Considerando os resultados obtidos com o Protocolo V e com o Protocolo VI, procurou-se avaliar o FBS como suplemento do meio de cultura. As culturas foram realizadas em frascos não revestidos, revestidos com colagénio e revestidos com poli-L-lisina, dando assim origem a três novos procedimentos.

Com isto, a digestão do material obtido foi consumada em meio de cultura enriquecido com 0,04 % de collagenase A, durante 24 horas que, após centrifugação a 200 G durante 8 minutos, foi colocado em tripsina/EDTA a 0,25% durante 10 minutos. O material digerido foi ressuspenso em meio de cultura suplementado com FBS a 15% ¹⁴, com 40 ng/ml de bFGF e com 20 ng/ml de EGF e então colocado em placa de cultura apropriada, conforme descrito na Tabela 4. A suplementação com fatores de crescimento foi efetuada de 4 em 4 dias. A monitorização e registo fotográfico tiveram performance diária.

Tabela 4: Revestimento da área de crescimento das placas usadas no Protocolo VII, no Protocolo VIII e no Protocolo IV.

	<i>Revestimento</i>
<i>Protocolo VII</i>	Nenhum
<i>Protocolo VIII</i>	Colagénio ²²
<i>Protocolo IX</i>	Poli-L-lisina ⁷⁴

Uma vez atingida confluência celular, aspirou-se o meio dos poços, efetuou-se uma lavagem com PBS e posteriormente, as células foram descoladas dos respetivos poços

com recurso a tripsina/EDTA, 200 µl por poço à temperatura de 37° e 5% de CO₂ durante um período aproximado de 5 minutos. Depois de destacadas, adicionou-se meio de cultura e as suspensões celulares foram distribuídas por placas com poços de maior área que, posteriormente, após nova confluência, se transferiram para frascos de cultura.

O Protocolo VII foi efetuado em córneas de ratos *Wistar*, num total de cinco experiências em que se utilizaram duas a seis córneas por cultura, perfazendo um total de 22 córneas. O Protocolo VIII foi efetuado em córneas de ratos *Wistar* num total de 8 córneas obtendo-se uma cultura primária. O Protocolo IX foi efetuado em cinco córneas humanas, duas amostras com duas córneas do mesmo dador por cultura primária e uma córnea noutra cultura. Também se utilizaram córneas de ratos *Wistar*, sendo cultivadas 8 córneas por amostra, num total de 48 córneas.

Resultados

Os resultados obtidos revelaram a eficácia do Protocolo VII salientando a importância do FBS enquanto suplemento. Mesmo em frascos não revestidos foi possível obter culturas com alguma estabilidade no tempo, sendo mantidas por várias semanas. Como se pode observar na Figura 15, foi possível observar proliferação celular com formação de monocamadas de células. As culturas apresentaram entre o quarto e o oitavo dia, colónias esféricas aderentes a partir das quais se originaram monocamadas passíveis de serem expandidas em cultura.

No que respeita ao Protocolo VIII, não existiu a formação de qualquer tipo de esferas ou monocamada. Daqui pode concluir-se que o revestimento com colagénio não era o mais adequado, tendo assim sido posto de lado. A experiência teve a duração de 20 dias.

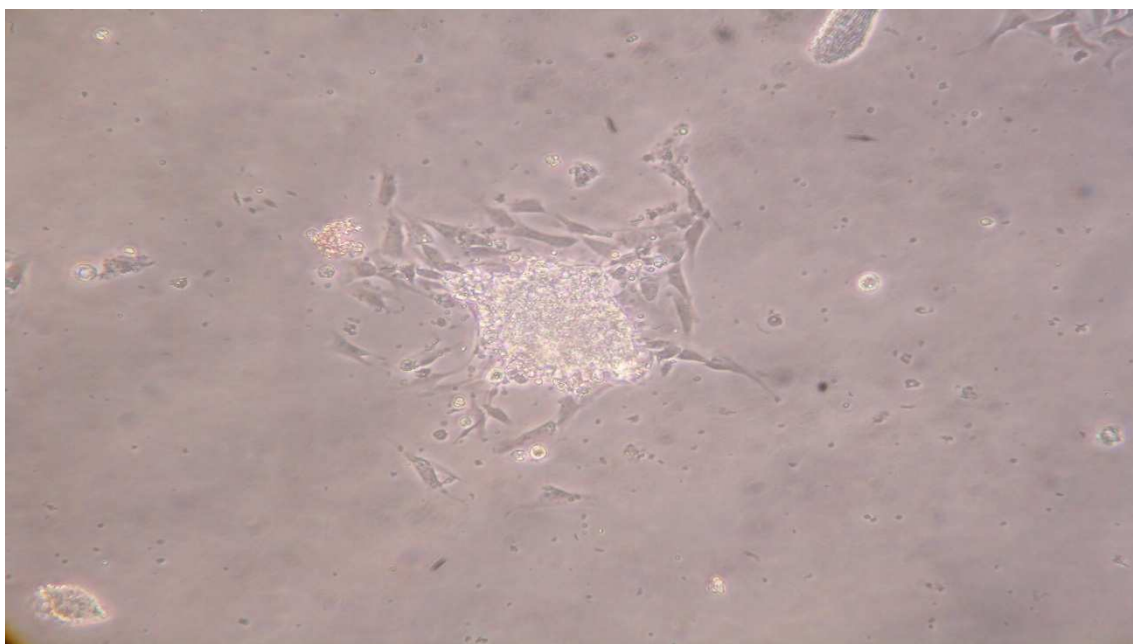


Figura 15: Imagem obtida no seguimento do protocolo VII, após 2 dias em cultura. Pode observar-se uma colônia esférica, aderente ao substrato, a dar origem a uma monocamada. Imagem obtida com ampliação de 100x.

O Protocolo IX foi o mais promissor, uma vez que em poucos dias, foi possível estabelecer culturas celulares de endotélio corneano de rato Wistar com sucesso, tal como se pode observar na Figura 16. Nos registos fotográficos depois de aproximadamente 48 horas foi possível observar grandes colónias esféricas aderentes das quais surgiram monocamadas de células. No que toca a material humano, foi possível observar esferas, mas não foi possível manter as culturas. No entanto, este facto pode dever-se à escassez de material. Estes resultados levaram à adoção do Protocolo IX como, protocolo otimizado, tendo sido este o que proporcionou melhores resultados.

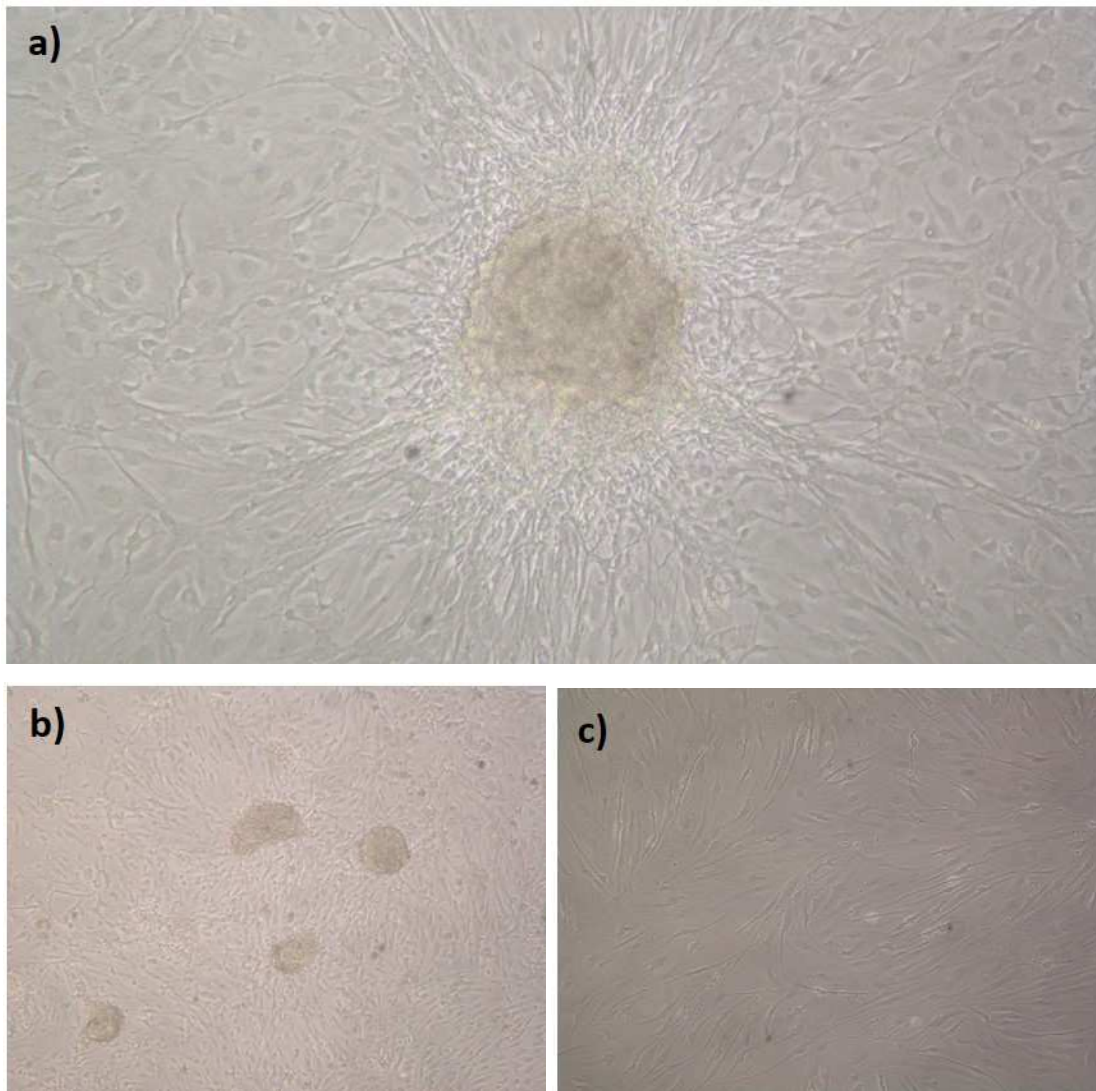


Figura 16: Imagens captadas na sequência da execução do protocolo IX. a) Na imagem observa-se uma esfera ao centro a dar origem a uma monocamada, após 8 dias em cultura celular. b) Podem observar-se inúmeras esferas a dar origem a uma monocamada celular, após 8 dias em cultura. d) Na imagem pode observar-se cultura celular estabelecida após 6 passagens, e 37 dias em cultura.

Capítulo V - Estudos de Imunocitoquímica

Após estabelecimento de culturas primárias de células de endotélio da córnea de ratos Wistar, tivemos de confirmar não só a origem assim como a manutenção *in vitro* das características deste tecido. Assim, procedeu-se aos estudos de imunocitoquímica, com marcadores específicos de proteínas que se sabem estar presentes nas células do endotélio da córnea.

A proteína *zonula-occludens* 1 (ZO-1) está presente nas *tight junctions*, complexos juncionais característicos do endotélio corneano. A proteína Na⁺/K⁺ ATPase é parte integrante da bomba de sódio-potássio, responsável pelo fluxo iónico nestas células ^{13,67}. Sabendo da existência de nichos de células estaminais presentes na periferia do endotélio corneano avaliou-se também a presença de proteínas marcadoras de células estaminais: a nestina e o colagénio do tipo 1 *alpha* 1 (COL1A1), que são marcadores de células imaturas e de células oriundas da crista neural, respetivamente ^{20,50}.

Para proceder a estes estudos, as culturas primárias foram feitas crescer sobre lamelas. Para tal, as lamelas previamente autoclavadas foram colocadas em placas de 12 poços que, seguidamente, foram revestidas com poli-L-lisina segundo o procedimento já descrito, no protocolo de revestimento de placas de cultura.

Assim, as culturas primárias foram destacadas pela ação da tripsina e as suspensões celulares obtidas foram distribuídas pelos poços com as lamelas. Aquando da obtenção da confluência desejada, o meio de cultura foi aspirado e realizaram-se três lavagens com PBS. As preparações foram fixadas com recurso a uma solução de PBS com 4% de paraformaldeído, sendo usado um volume de 500 µl/poço e incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. Aspirou-se a solução e posteriormente efetuaram-se três lavagens sequenciais com PBS. De seguida, realizaram-se três incubações, com duração individual de 5 minutos à temperatura ambiente, com uma solução de PBS contendo 0,02% de BSA e 0,02% de azida de sódio, PBS-BA.

De seguida, promoveu-se a permeabilização das células incubando-as com uma solução de PBS-BA com 1% de triton X-100, com um volume de 500 µl de solução em cada poço, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Terminada a permeabilização efetuaram-se novas lavagens com PBS-BA (3 lavagens com duração de 5 minutos cada).

Seguidamente incubaram-se as preparações com anticorpo primário diluído na solução de PBS-BA. A incubação foi efetuada com a lamela colocada numa lâmina, com a cultura celular virada para baixo, em 50 µl de solução de anticorpo com PBS-BA, *overnight* em câmara húmida, no escuro à temperatura de 4°C.

Neste passo, e devido às diferentes características de cada anticorpo, o procedimento sofreu algumas variações. Assim, começou-se por utilizar os *starting- points* aconselhados nas bulas dos respetivos anticorpos, sendo estes otimizados de acordo com os resultados obtidos. No caso do anticorpo anti-*alpha* 1 Na⁺/K⁺ ATPase (Abcam, ab2867) a diluição utilizada foi de 1:20 µl (Anti Na⁺/K⁺ ATPase: PBS-BA), para o anticorpo anti ZO-1 (LifeTechnologies-Novex, 40-2200) utilizou-se uma diluição de 1:50 µl (Anti ZO-1: PBS-BA), no caso do anticorpo anti nestina (Abcam, ab6320) a diluição eleita foi de 1:200 µl (Anti Nestina: PBS-BA) e o anticorpo anti colagénio do tipo 1 *alpha* 1 (Santa Cruz Biotchnologies inc., sc8784) foi diluído numa proporção de 1:5 µl (Anti Colagénio 1 *Alpha* 1: PBS-BA), como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Informação acerca dos anticorpos utilizados em imunocitoquímica.

<i>Anticorpo</i>	<i>Empresa</i>	<i>Código</i>	<i>Diluição</i>
Anti <i>alpha</i> 1 Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Abcam	ab2867	1:20 µl
Anti ZO-1	Life Technologies-Novex	40-2200	1:50 µl
Anti nestina	Abcam	ab6320	1:200 µl
Anti COL1A1	Santa Cruz Biotechnologies inc.	sc8784	1:50 µl

Após a incubação com o anticorpo primário a preparação foi recolocada na placa com a cultura celular virada para cima e foi efetuada nova série de 3 lavagens com 500 µl de PBS-BA durante 5 minutos cada.

Posteriormente, procedeu-se à incubação com anticorpo secundário, escolhido de acordo com a origem do anticorpo primário. No caso do anti Na⁺/K⁺ ATPase e do anti

nestina o anticorpo secundário utilizado foi do tipo *goat* anti *mouse* (Santa Cruz Biotechnologies inc., sc3738), para o anti ZO-1 o anticorpo secundário escolhido foi do tipo *mouse* anti-*rabbit* Igg PE (Santa Cruz Biotechnologies inc., sc3753) e para o anti colagénio do tipo 1 *alpha* 1 usou-se um anticorpo secundário do tipo *mouse* anti *goat* Igg FITC (Santa Cruz Biotechnologies inc., sc2356). Os anticorpos secundários utilizados foram diluídos em PBS-BA na proporção de 1:200 µl, e as lamelas foram colocadas sobre lâminas com a cultura celular virada para baixo com 50 µl de solução em câmara húmida e no escuro. Este processo teve a duração de 1 hora e 30 minutos.

No fim da incubação com anticorpo secundário deu-se início a nova série de lavagens (500 µl, 3 vezes, com duração individual de 5 minutos) e, posteriormente, colocaram-se as lamelas viradas para baixo sobre lâminas utilizando como meio de montagem 5 µl de *ProLong® gold antifade reagent with DAPI* (Life Technologies™, P36931) *overnight*, tendo em vista também a marcação dos núcleos.

Por fim, selaram-se as lamelas nas lâminas com o recurso a verniz e observaram-se os resultados em microscópio de fluorescência (Leica, DM 4000).

Com o intuito de confirmar a especificidade da marcação e verificar se o anticorpo secundário se poderia ligar às células por si só, podendo alterar a fluorescência observada nos resultados obtidos, realizaram-se experiências iguais em que se omitiu o passo de incubação com o anticorpo primário. Nestas experiências não foi visível qualquer fluorescência, validando assim os protocolos obtidos.

Procedeu-se ainda a um outro protocolo com o objetivo de marcar a membrana celular e observar a sua forma. Assim, no passo em que normalmente se procederia à incubação com anticorpo primário adicionou-se 1 µl de CellMask (Invitrogen, c100-46) em 499 µl de PBS-BA, e incubou-se a preparação durante meia hora, procedendo de seguida a uma série de lavagens e posterior montagem da preparação com *ProLong® gold antifade reagent with DAPI*.

No caso do anticorpo ZO-1 foi também efetuado um controlo positivo, uma vez que a marcação com o mesmo, em células de endotélio corneano era quase inexistente. Assim, pensou-se ser necessário um controlo positivo utilizando outro tipo celular de forma a inferir se o anticorpo funcionava corretamente. Para tal utilizou-se o anticorpo primário com uma diluição de 1:50 µl e o anticorpo secundário com uma diluição de

1:200 μ l. A linha celular utilizada foi a C2Bbe1, por estar referenciada na bula do anticorpo e por se encontrar disponível no Laboratório de Cultura de Linhas Celulares da Unidade de Biofísica.

Resultados

Os estudos de imunocitoquímica com o anticorpo anti Na^+/K^+ ATPase, que foram realizados em seis experiências independentes mostraram que $99,6 \pm 1,4\%$ das células analisadas foram positivas para este marcador. Nas imagens da Figura 17 pode observar-se marcação em todas as células presentes nos campos fotografados.

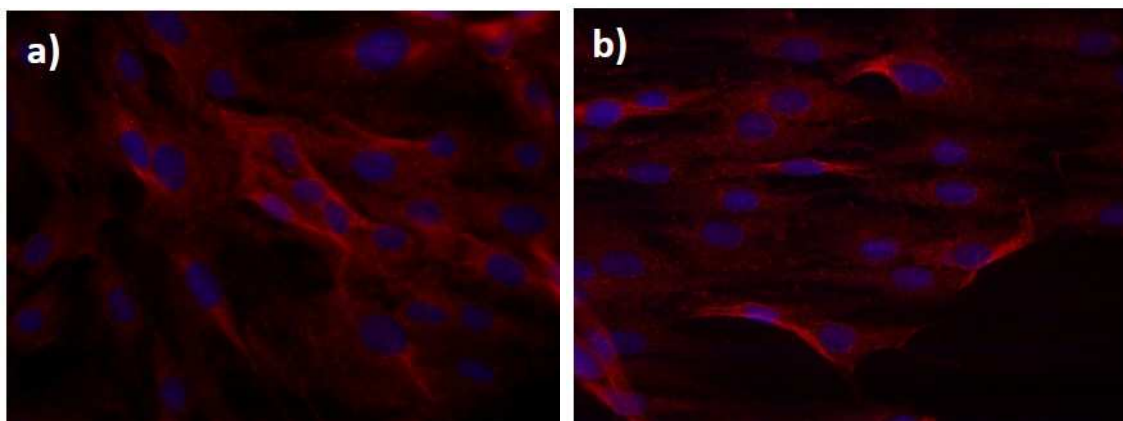


Figura 17: a) e b) Imagens obtidas por microscopia de fluorescência representativas da marcação, a vermelho, da Na^+/K^+ ATPase. Os núcleos estão marcados com DAPI e representados a azul. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 630x.

Os estudos realizados com o anticorpo anti ZO-1, proteína responsável pela formação de *tight junctions*, realizados num total de cinco experiências mostraram marcação pontual, em apenas algumas das células na preparação, ou mesmo, inexistente. Para comprovar que o procedimento de marcação foi o adequado, e sabendo que esta proteína se encontra presente em células C2Bbe1, disponíveis e de

fácil acesso no Laboratório de Cultura de Linhas Celulares da Unidade de Biofísica, efetuou-se a mesma experiência com estas células, como controlo positivo, e foi possível observar a positividade da marcação em 100% das células observadas. As imagens representativas da marcação com o anticorpo contra ZO-1 são apresentadas na Figura 18.

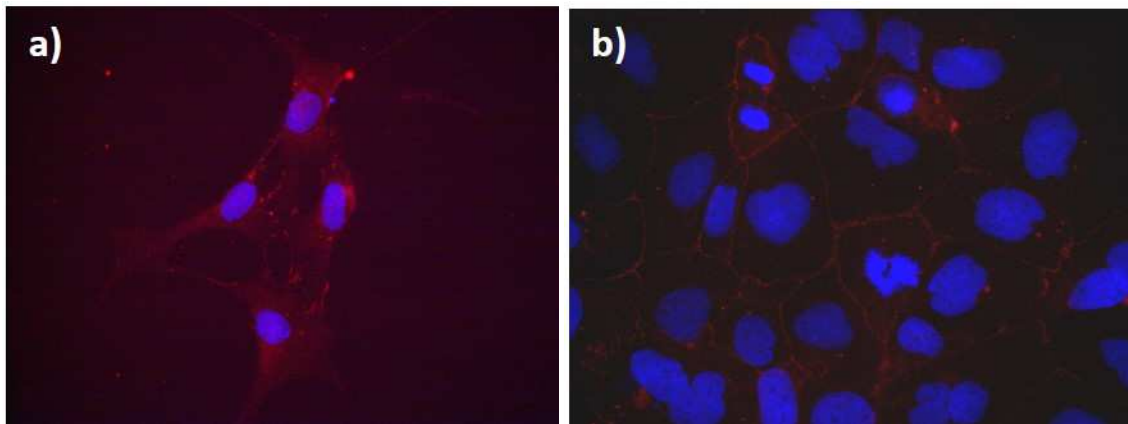


Figura 18: Imagens obtidas por microscopia de fluorescência da marcação, a vermelho, de ZO-1. Os núcleos estão marcados com DAPI e representados a azul. a) Observa-se uma imagem das culturas primárias obtidas. b) Observam-se imagens das células C2Bbe1, utilizadas como controlo positivo. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 630x.

Para avaliar a marcação de nestina, proteína presente em células estaminais, foram realizadas quatro experiências independentes nas quais se observou marcação positiva em todos os ensaios com $91,3 \pm 19,5\%$ de células marcadas. As imagens representativas desta marcação estão apresentadas na Figura 19.

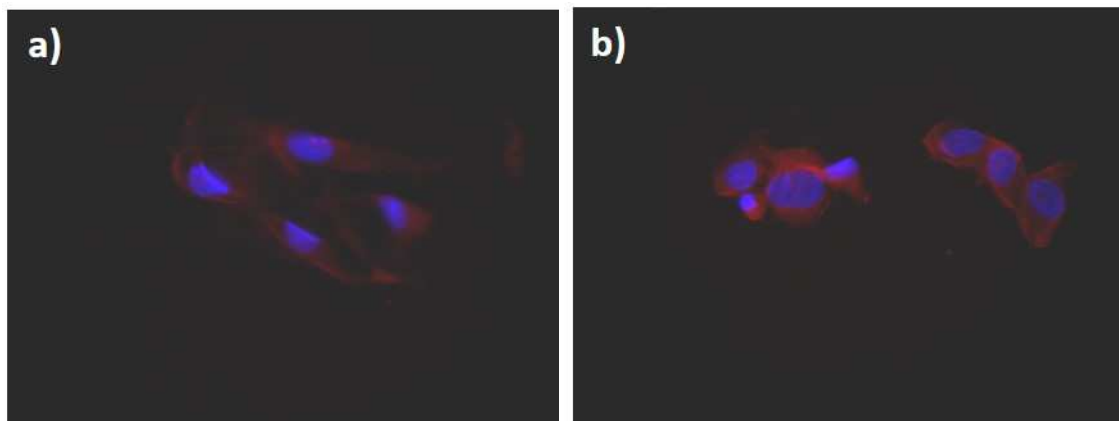


Figura 19: a) e b) Imagens obtidas por microscopia de fluorescência da marcação, a vermelho, da nestina. Os núcleos estão marcados com DAPI e representados a azul. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 630x.

Relativamente ao colagénio do tipo 1 alpha 1, marcador de células estaminais, foram realizadas 4 experiências independentes. Após a análise das imagens obtidas verificou-se marcação em todas as lamelas analisadas, com marcação em $99,6 \pm 2,0\%$ das células, conforme representado na Figura 20.

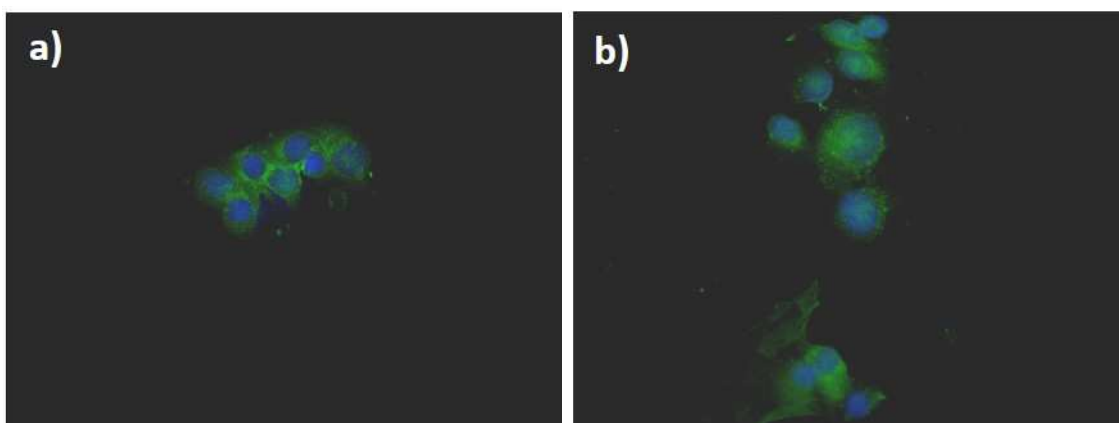


Figura 20: a) e b) Imagens obtidas por microscopia de fluorescência da marcação, a verde, de COL1A1. Os núcleos estão marcados com DAPI e representados a azul. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 630x.

A marcação com CellMask foi realizada num total de três experiências independentes. Da observação da marcação das membranas podemos inferir que a grande maioria das células não apresenta forma hexagonal. Podemos no entanto observar que algumas células têm essa característica presente, como demonstrado na Figura 21.

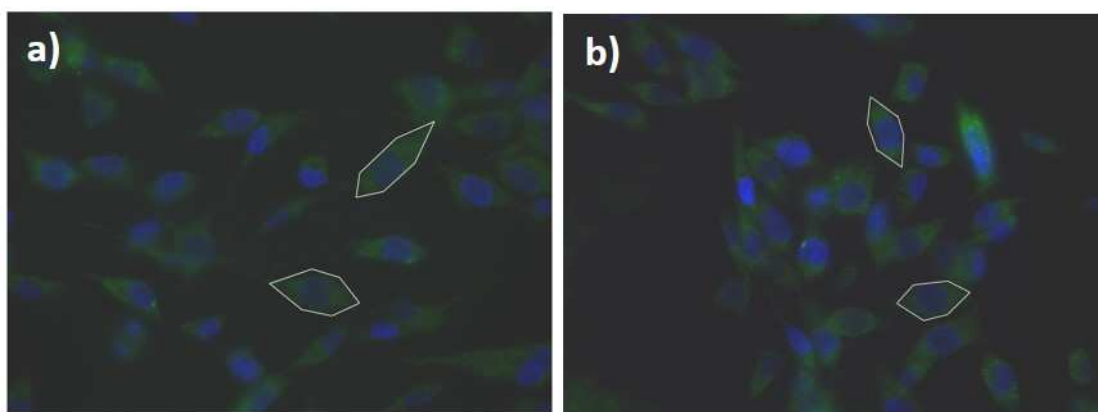


Figura 21: a) e b) Imagens obtidas por microscopia de fluorescência da marcação, a verde, da sonda CellMask. Os núcleos estão marcados com DAPI e representados a azul. A branco os contornos de algumas células com forma hexagonal. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 630x.

Capítulo VI - Discussão

O endotélio corresponde a uma camada da córnea, já descrita no capítulo 1, composta por células com morfologia hexagonal, com características muito específicas, que permitem manter o balanço iônico e hídrico na córnea ²⁰. Pela incapacidade destas células se dividirem *in vivo*, a perda celular é combatida através do alargamento e da migração das restantes células endoteliais ²⁵. Quando se atinge o número limiar de células capazes de desempenhar as funções do endotélio, a córnea começa a apresentar opacidade progressiva e o doente perde acuidade visual ⁷⁵.

A disfunção endotelial é a principal indicação para o transplante de córnea. A evolução técnica nas últimas duas décadas levou ao desenvolvimento e à implementação clínica dos transplantes lamelares posteriores como tratamento *gold standard* nas endoteliopatias. Assistimos, na última década, a uma mudança no paradigma dos transplantes de córnea, estando as queratoplastias lamelares a ser preferidas em detrimento das penetrantes. Esse transplante de espessura parcial substitui apenas o tecido danificado, em vez de toda a córnea.

A tendência atual é reservar os transplantes de córnea penetrantes para os casos de doença afetando toda a espessura da córnea. Idealmente, o transplante lamelar posterior deve ser o mais fino possível, pois assim proporciona melhores resultados visuais. Atualmente, conseguem-se obter lentículos para DSAEK (*descemet-stripping automated endothelial keratoplasty*) ultra-finos de 100 µm de espessura com recurso às mais recentes tecnologias (microqueratômicos e laser de femtosegundo). Este lentículo é constituído pelo endotélio, a membrana de Descemet e uma porção de estroma posterior. Por seu lado, o DMEK (*descemet membrane endothelial keratoplasty*) utiliza lentículos ainda mais finos mas, que por isso mesmo, são muito difíceis de manipular e estão sujeitos a grandes perdas endoteliais durante a sua preparação e a inserção, com elevadas taxas de falência pós-operatória. O transplante de células isoladas é um conceito extremamente apelativo neste contexto, por permitir a repopulação unicamente das células doentes e ser uma técnica minimamente invasiva. Alguns grupos têm-se debruçado sobre formas de expansão *ex vivo* e de transplante destas células.

O endotélio corneano tem sido exaustivamente estudado e é possível encontrar artigos acerca da necessidade de expansão do mesmo desde a década de 60 do século passado. No entanto, apesar da grande maioria dos autores reportar resultados de

sucesso, não existe ainda um protocolo estabelecido que seja consensual e reprodutível para a cultura *ex vivo* de células do endotélio da córnea. Deste modo, a falta de um protocolo eficaz e reprodutível tem sido um grande entrave à prossecução desta ideia. Com este trabalho, pretendeu-se contribuir para o estabelecimento de um protocolo de expansão *ex vivo* de células do endotélio da córnea, que fosse simples e reprodutível. Para estabelecer, com sucesso, um sistema para uma cultura *in vitro* de um tipo específico de células é necessário satisfazer um determinado número de requisitos. Estes incluem o método de isolamento, a modificação da superfície de cultura, a seleção do meio de cultura e a sua suplementação com fatores de crescimento específicos ⁴⁸. Assim, com este estudo foi possível avaliar os efeitos de várias condições de cultura de células endoteliais corneanas.

O procedimento experimental adotado inicialmente passou pelo estabelecimento de culturas primárias a partir do protocolo de formação de esferas. O racional para a escolha deste protocolo assenta na possibilidade de se obterem células precursoras que, em teoria, têm maior capacidade formadora de colónias. Mimura *et al.* referiram que as células isoladas através deste método possuem telómeros de maior comprimento, sugerindo assim que teriam uma maior capacidade proliferativa ⁵⁷. O procedimento teve como base os trabalhos de Yokoo *et al.* que reportam sucesso na formação de esferas de células precursoras de células de endotélio corneano humano através do protocolo de formação de esferas, sendo adaptado e sujeito a otimizações sucessivas de acordo com a análise dos resultados obtidos ⁵³.

Assim, foi inicialmente testado um protocolo de digestão enzimática com collagenase e as células colocadas sobre superfície revestida com polyHema em meio DMEM-F12 (protocolo I). O protocolo I revelou baixa capacidade de digestão, tornando impossível a obtenção de esferas provenientes de células precursoras isoladas. A digestão do tecido neste protocolo consistiu na adição de collagenase a 0,02% em meio de cultura com tempo de incubação de 16 horas seguida de nova digestão com tripsina/EDTA na concentração de 0,05% durante 10 minutos. Esta elevada resistência que as células apresentaram à ação da collagenase pode dever-se à firme ligação celular relacionada com a sua matriz extracelular subjacente limitando assim o processo global de separação celular ⁵⁶.

Perante estes resultados, procurou-se otimizar a digestão do tecido. Assim, o protocolo II consistiu no aumento do tempo de incubação com collagenase para 24 horas e um aumento da concentração de tripsina/EDTA para 0,25 %. Com esta alteração, embora a cultura revelasse ainda digestão incompleta dos tecidos, foi possível a obtenção de colónias esféricas em suspensão, tanto em material humano como em material de rato Wistar. No entanto, estas culturas perderam a sua viabilidade celular precocemente, culminando na perda do material em estudo antes dos dez dias de cultura, impedindo a transição para ambiente adequado à expansão em condições de cultura aderente. A perda de material poderá ter-se devido à baixa confluência, ou seja, ao baixo número de células com que foi possível iniciar as culturas, ou à possibilidade de as condições de cultura adotadas não serem ideais.

Uma vez que a digestão enzimática foi ainda incompleta, testou-se um procedimento de digestão com recurso à dispase de acordo com o protocolo descrito por Ishino *et al.* ¹⁵ (protocolo III). No entanto, este protocolo de digestão não revelou eficácia, tendo sido descartado. Além disso, o eventual aumento do tempo de incubação ou da concentração da dispase foi descrito como possível causa de desintegração celular resultando na diminuição do rendimento das culturas ⁷. A ineficácia deste procedimento pode ter origem nas características do endotélio que podem impedir a ação da dispase devido à proximidade célula-célula, o que dificultaria o acesso desta enzima aos locais de clivagem das proteínas-alvo ⁵⁶. Sabe-se que a dispase cliva a fibronectina e o colagénio IV, no entanto o endotélio para além de fibronectina e de colagénio IV possui também na sua matriz colagénio V, daí que outra hipótese explicativa para a ineficácia da dispase possa estar relacionada com a sua incapacidade de clivar o colagénio V, impedindo assim a total separação celular ⁷¹.

Retomou-se então o racional do procedimento de digestão dos protocolos I e II, aumentando a concentração de collagenase para o dobro (0,04%), com manutenção do tempo de incubação e da concentração de tripsina/EDTA (protocolo IV). Apesar de a cultura de material de origem humana não ter demonstrado sucesso, as culturas primárias com origem em células endoteliais corneanas de rato Wistar apresentaram formação de esferas ao quarto dia. Os resultados obtidos apontaram para uma digestão eficaz, como reportado por Mimura *et al.* ⁷⁴ e Bednarz *et al.* ⁷⁶, o que motivou a adoção

deste procedimento para a digestão. A collagenase atua a nível do colagénio que é parte integrante deste tecido ⁷⁰. Adicionalmente a tripsina cliva os peptídeos no lado do terminal C dos resíduos dos aminoácidos lisina e arginina ⁷². A utilização conjunta destas enzimas pode ter contribuído para um efeito sinérgico que proporcionou uma digestão adequada nas concentrações e nos tempos de incubação utilizados.

De seguida, procurou-se otimizar as condições de cultura, por forma a manter a viabilidade celular. Os resultados até aqui observados no protocolo IV, mostraram possível a organização de agregados celulares em esferas de células precursoras com presumível origem nas células de endotélio corneano em meio sem soros. Estes resultados remetem para a possibilidade de estas esferas de células precursoras se diferenciarem em células semelhantes às células endoteliais ⁵³.

Considerando as dificuldades em manter a viabilidade das esferas em cultura e de proporcionar a proliferação celular, ponderou-se a utilização de soros como o BSA e o FBS que se sabe serem capazes de potenciar o crescimento das culturas ⁴⁸. O recurso a diferentes revestimentos das superfícies dos poços de placas de cultura foi também testado, numa tentativa de aumentar a eficácia do sistema de cultura. Assim, para além das superfícies revestidas com polyHema, foi testada a eficácia de placas sem revestimento e do revestimento com colagénio, e com poli-L-lisina.

Assim, nos protocolos subsequentes optou-se por colocar o material submetido a digestão enzimática diretamente em condições de cultura aderente. Esta opção justificou-se pelo conhecimento de que a adesão celular pode aumentar a capacidade proliferativa das células. A grande maioria dos tipos celulares, tal como o endotélio, crescem em monocamadas celulares, tendo por isso de aderir para promover o estímulo proliferativo. Sabe-se também que a adesão celular é mediada por recetores da matriz extracelular, pelo que alguns tipos celulares segregam proteínas da matriz extracelular antes de iniciarem a divisão ⁵⁴. A adoção de um método de cultura aderente pretendeu mimetizar o ambiente em que o endotélio corneano se desenvolve. O colagénio e a poli-L-lisina foram comparados com a ausência de revestimento, em vez do revestimento com polyHema utilizado anteriormente para o estabelecimento de colónias esféricas em suspensão.

Nos protocolos V e VI, de modo a evitar o uso de FBS, devido à variabilidade da sua composição, ao potencial risco de infeção e aos problemas éticos relacionados com o método de recolha do soro, optou-se primariamente por recorrer ao BSA enquanto suplemento ^{51,77}. Os resultados obtidos revelaram insucesso do BSA como promotor da proliferação de culturas de endotélio corneano. O insucesso deste procedimento pode estar relacionado com a diminuição da capacidade de adesão das células à superfície das placas, provocada pelo BSA e reportada por Kan *et al.* ⁷⁸, mesmo com recurso a matrizes potenciadoras de adesão celular. Este resultado levou à rejeição da suplementação com BSA.

Apesar das referidas desvantagens, optou-se pela utilização de FBS que, por outro lado, é um componente de fácil acesso, atrativo para utilização em estudos laboratoriais. No futuro, e na perspetiva de transpor este procedimento de cultura de células para uso clínico em medicina regenerativa, em que se pretende evitar a utilização de produtos de origem animal, o FBS poderia ser substituído por soro autólogo, isto é, soro humano obtido a partir do sangue do próprio doente ⁷⁹.

As culturas primárias, de origem em córneas de ratos Wistar, foram estabelecidas sobre placas de cultura não revestidas, placas de cultura revestidas com colagénio e ainda placas de cultura revestidas com poli-L-lisina nos protocolos VII, VIII e IX, respetivamente.

O revestimento com colagénio não favoreceu a cultura celular, uma vez que não potenciou a sua adesão e a sua expansão, não sendo possível observar colónias de células ao longo do tempo de cultura. Este protocolo foi por isso abandonado. O endotélio corneano assenta numa membrana basal de colagénio, a membrana de Descemet, segregada pelas suas células. Durante o desenvolvimento embrionário a membrana de Descemet produzida pelo endotélio corneano é composta por colagénio de aspeto estriado. Posteriormente, após o nascimento, a membrana de Descemet continua a ser segregada pelo endotélio, no entanto o colagénio produzido não apresenta padrão estriado ²⁶. O colagénio produzido pelo endotélio é dos tipos IV e V ⁸⁰. A razão pela qual o revestimento com colagénio falhou no protocolo efetuado pode prender-se com o tipo de colagénio utilizado no revestimento, colagénio tipo I, por este apresentar características diferentes dos tipos de colagénio produzidos pelo endotélio

corneano, os tipos IV e V. Grushwitz *et al.* estudaram o mecanismo de interação entre as células de endotélio corneano humano e observaram interação específica entre o endotélio corneano e o colagénio do tipo I, em que o endotélio corneano provoca a destruição da matriz de colagénio do tipo I em poucas horas, podendo esta ser uma razão para o protocolo com matriz de colagénio do tipo I não ter permitido a obtenção de uma cultura de células de endotélio de córnea ⁸¹.

Nas culturas em placas não revestidas foi possível observar pequenos agregados celulares que foram crescendo e que acabaram por dar origem a uma monocamada cuja cultura foi possível manter durante várias semanas e várias passagens. Estes resultados apontam para a importância do uso de FBS para a proliferação das culturas de endotélio corneano, caracterizadas pela sua baixa ou mesmo ausente capacidade de divisão *in vivo*. De facto, seria de esperar que estas células necessitassem de suplementos que impulsionassem a sua divisão e crescimento em cultura, devido às suas características *in vivo*. Sabendo que o endotélio corneano tem baixa capacidade proliferativa *in vivo*, e que a adição de soro, que contém um amplo espectro de macromoléculas, proteínas transportadoras de substâncias lipóides, agentes de fixação e propagação, nutrientes de baixo peso molecular, e fatores de crescimento, potencia a proliferação celular ⁷⁷.

O protocolo IX em que, resumidamente, o meio de cultura foi suplementado com FBS e a cultura iniciada em placas revestidas com poli-L-lisina, foi o que melhores resultados apresentou. Em apenas dois dias foi possível observar colónias esféricas aderentes, a partir das quais se originou uma monocamada que, em poucos dias, se apresentou confluenta. A poli-L-lisina é um revestimento polimérico usado em cultura de células, e pensa-se que o seu mecanismo de ação medeia a interação entre as cargas negativas das superfícies e das células num processo dependente de energia, sendo para tal necessária a existência de grupos amina livres ⁸². Assim a ação do revestimento com poli-L-lisina, com propriedades indutoras de adesão celular, juntamente com os agentes de fixação presentes no FBS parecem ter culminado numa relação sinérgica positiva de adesão e de proliferação celular, tendo sido este o protocolo eleito para as restantes culturas realizadas.

Apesar de os resultados serem rápidos e ter sido possível estabelecer a cultura de células de endotélio da córnea de rato Wistar, todas as tentativas com endotélio de

dadores humanos falharam. No entanto este facto pode dever-se à qualidade das córneas fornecidas pelo Banco de Olhos, uma vez que, correspondendo a material cedido por ser inapto para transplante, as mesmas apresentavam baixas contagens celulares ou tinham ultrapassado o limite de tempo de conservação. Outra razão pode prender-se com o facto de que apenas por duas vezes foi possível juntar duas córneas do mesmo dador, enquanto as amostras de endotélio corneano de ratos compreendiam várias córneas por cultura primária, por norma 8 córneas por amostra. K L Fitch *et al.* relatam que o número de células de endotélio corneano de rato é semelhante ao número de células de endotélio corneano em humanos, com aproximadamente 2500 cell/mm² em ratos adultos⁸³. Existia, pois, uma desigualdade na quantidade de endotélio disponível entre amostras humanas e amostras de rato. Nas culturas humanas o número máximo de células foi de 4000 cell/mm², aproximadamente, enquanto nas culturas de rato o número máximo de células no início das culturas foi de, conceptualmente, 20000 cell/mm². No entanto, devido à colheita e digestão do material o número de células em cultura foi inferior aos máximos possíveis. Segundo R Ian Fresheney, apenas as células com capacidade para migrar a partir do explante ou que sobrevivem ao processo de digestão e aderem podem dar origem a culturas primárias⁵⁴.

Depois de estabelecida a cultura com sucesso, como se pode observar na Figura 16 no capítulo IV, e apesar de o tecido colhido para o estabelecimento das culturas estar restrito à localização anatómica do endotélio corneano, procurou-se validar a sua origem através de estudos de imunocitoquímica. Para tal, e com base nos estudos de Barry ¹³ e Yokoi ⁹ recorreu-se a marcadores característicos de células endoteliais corneanas como a *zonula occludens 1* (ZO-1) e a Na⁺/K⁺ ATPase, proteínas fundamentais nas *tight junctions* e na bomba de sódio-potássio, respetivamente ^{65,66}. Sabendo da presença de nichos de células estaminais na periferia do endotélio, avaliou-se também a presença de nestina, um marcador de células imaturas e de colagénio do tipo 1 *alpha* 1, um marcador de superfície de células provenientes da crista neural, marcadores reportados por vários autores, entre os quais Brandl ⁵⁰ e Scott ⁴. Desta forma pode avaliar-se a origem da cultura celular obtida bem como a manutenção do fenótipo ^{10,20,64}.

A presença da bomba de sódio-potássio na cultura celular foi avaliada pela marcação com um anticorpo anti Na⁺/K⁺ ATPase, que se liga especificamente a esta proteína e posterior marcação com um anticorpo secundário específico para o primeiro capaz de emitir fluorescência; os núcleos foram marcados com o meio de montagem Prolong que contém DAPI. Como resultado observou-se marcação de cor vermelha, em 99% das células observadas, o que permitiu concluir que a proteína de interesse, neste caso a Na⁺/K⁺ ATPase, se encontra presente nas células das culturas obtidas, o que corrobora a origem das culturas primárias em células do endotélio. Como se pode observar na Figura 17 do capítulo V, a marcação apresenta-se uniformemente distribuída por toda a célula.

Devido à proximidade anatômica, os queratinócitos do estroma constituiriam o principal tipo celular, potencial contaminante, das culturas primárias obtidas. Scott ⁴ descreveu os queratinócitos como células mesenquimais especializadas responsáveis por produzir e por manter a matriz extracelular do estroma da córnea. Aquelas células apresentam morfologia dendrítica e achatada, sendo capazes de se tornar fibroblásticas em resposta a lesões, produzindo matrizes celulares anormais e que são prejudiciais à transparência da córnea ⁴. De acordo com a bibliografia que conhecemos, a expressão da proteína Na⁺/K⁺ ATPase não foi reportada nos queratinócitos ⁴. Assim os resultados obtidos permitem excluir a contaminação das culturas com este tipo celular.

A avaliação da expressão da proteína *zonula-occludens* 1, característica das *tight junctions*, fundamentais para a ligação célula a célula e a sua disposição em monocamada, revelou marcação vermelha fraca ou até mesmo inexistente, para as células de endotélio corneano, sendo a percentagem de células marcadas de apenas 20%. Nos estudos realizados na linha celular C2BBE1 verificou-se a expressão positiva da proteína ZO-1 nas membranas de todas as células presentes nos campos observados, como se pode verificar na Figura 18 do capítulo V. No que respeita às culturas primárias de endotélio corneano a presença da proteína ZO-1 em apenas algumas células, e não em todas, pode relacionar-se com as diferenças dos microambientes *in vivo* e *in vitro* ⁵⁴. Apesar de se ter tentado mimetizar o ambiente *in vivo*, o microambiente é amplamente distinto daquele que se proporciona *in vivo* ⁵⁴. A própria área de expansão que se proporcionou às culturas primárias pode justificar a ausência de *tight junctions*, uma vez

que, de forma a proteger a cultura celular de inibição de proliferação por contacto, a confluência total nunca foi atingida. Nestas condições, as células nem sempre apresentaram a morfologia hexagonal típica do endotélio, como se pode verificar nos estudos realizados com a sonda CellMask, representados no capítulo V pela Figura 21, e não existindo proximidade suficiente esta pode ser uma hipótese explicativa para que estas células não estabeleçam *tight junctions*. Para além deste obstáculo, o facto de estas células poderem ter origem nos nichos de células estaminais, cuja existência já foi abordada no capítulo 1, e conseqüentemente não se encontrarem completamente diferenciadas, pode constituir outro motivo pelo qual estas células não apresentaram, *in vitro*, fenótipo semelhante ao *in vivo*.

A nestina, proteína cuja presença assinala células imaturas, foi então avaliada mediante o uso do anticorpo anti-nestina e o seu anticorpo secundário correspondente, cuja especificidade também foi testada na ausência de anticorpo primário. Todos os ensaios apresentaram marcação de cor vermelha numa percentagem de 91%, como se pode observar na Figura 19 do capítulo V. Mediante os resultados obtidos na marcação com nestina é possível afirmar que as culturas obtidas apresentam características de células estaminais ou progenitoras, o que corrobora a hipótese anterior acerca da ausência de expressão da proteína ZO-1. O potencial das células estaminais pluripotentes tem sido reportado e explorado na medicina regenerativa para a terapêutica e para a clínica ¹⁵. Assim, as culturas de células de endotélio corneano com características de células estaminais poderão constituir uma mais-valia, se contribuíssem para ultrapassar dificuldades como o diminuto número de córneas para transplante ⁵⁷. Os resultados obtidos no presente estudo laboratorial permitem perspetivar que, no futuro, a obtenção de culturas de células endoteliais humanas permitiriam a obtenção de culturas de células de origem estaminal do próprio doente. Induzindo estas células à diferenciação em células de endotélio corneano seria possível suprimir a necessidade de córneas de dadores, representando um avanço importante em medicina regenerativa ^{15,57}.

Por fim avaliou-se a presença de marcação para o colagénio do tipo 1 *alpha 1* e observou-se marcação de cor verde numa taxa de 99,6% como se pode verificar na Figura 20 no capítulo V. Da observação destes resultados é possível inferir que as

culturas celulares obtidas têm origem na crista neural, assim como as células de endotélio corneano, uma vez que se pode observar elevada expressão desta proteína.

As culturas celulares obtidas tiveram pois origem em células derivadas da crista neural e apresentam elevada expressão da proteína Na^+/K^+ ATPase, responsável pelo funcionamento da bomba sódio-potássio, tal como as células de endotélio corneano. Por outro lado, a expressão de nestina indica que as culturas obtidas apresentam características de células estaminais e, portanto, diferenciação incompleta, o que justifica a baixa expressão de *zonulae occludens* 1 e formação de *tight junctions* assim como a típica morfologia hexagonal. Estas diferentes características fenotípicas poderão também estar relacionadas com o próprio o microambiente *in vitro* no qual as interações célula-célula e célula-matriz celular se encontram reduzidas ⁵⁴.

Tendo estabelecido com sucesso várias culturas primárias de células de endotélio corneano de ratos Wistar, perspectiva-se no futuro transportar esta eficácia para culturas de endotélio humano, permitindo alargar o volume de estudos do endotélio da córnea humana e abrir portas na medicina regenerativa e terapêutica de disfunções endoteliais.

Capítulo VII - Conclusão

Deste trabalho, que teve como objetivo principal a expansão de células de endotélio corneano *ex vivo*, através da otimização do protocolo de cultura de células, foi possível retirar várias conclusões.

1. Foi possível estabelecer culturas primárias de células de endotélio corneano de ratos Wistar.
2. O soro bovino fetal foi essencial para a manutenção da cultura de células de endotélio corneano.
3. A albumina sérica de bovino não potenciou a capacidade de proliferação das células de endotélio corneano.
4. O revestimento de placas e de frascos de cultura com poli-L-lisina, apesar de não ser essencial para a cultura de células endoteliais corneanas, contribui positivamente para o processo de expansão das mesmas.
5. O revestimento das superfícies de adesão celular com colagénio do tipo I, não é eficaz na cultura de células de endotélio corneano.
6. Os estudos de imunocitoquímica mostraram que as células expandidas expressam proteínas específicas de endotélio corneano, como a Na^+/K^+ ATPase.
7. As culturas primárias obtidas derivam da crista neural, tal como as células de endotélio corneano, como ficou provado pela expressão de nestina.
8. A morfologia exibida pelas culturas obtidas difere das células de endotélio corneano, possivelmente por estas não se encontrarem completamente diferenciadas e pelas características do meio ambiente.

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico
BSA	Albumina de soro bovino
Cox IV	Oxidase IV do citocromo C
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DSAEK	<i>Descemet stripping automated endothelial keratoplasty</i>
DMEM-F12	Dulbeccos Modified Eagle Medium e Hams Nutrient Mixture
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FBS	Soro bovino fetal
NBS	Soro normal de bovino adulto
PBS	Tampão salino de fosfato
PBS-BA	Tampão salino de fosfato com 0,02% de Albumina de soro bovino e 0,02% de Azida de sódio
PolyHema	Poli(2 hidroxietilmetacrilato),
ROCK	Rho-cinase
TGF- β 2	Fator de crescimento transformante beta 2
ZO-1	Zonula Occludens 1
COL 1 α 1	Colagénio 1 <i>alpha</i> 1

Referências Bibliográficas

1. Di Girolamo N. Stem cells of the human cornea. *British Medical Bulletin*. 2011;100:191-207.
2. Levis HJ, Peh GSL, Toh K-P, et al. Plastic compressed collagen as a novel carrier for expanded human corneal endothelial cells for transplantation. *PLoS One*. 2012;7(11):e50993.
3. Yu WY, Sheridan C, Grierson I, et al. Progenitors for the Corneal Endothelium and Trabecular Meshwork : A Potential Source for Personalized Stem Cell Therapy in Corneal Endothelial Diseases and Glaucoma. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011.
4. Sherri-Gae Scott ASJ and SC. Sphere formation from corneal keratocytes and phenotype specific markers. *National Institutes of Health*. 2012;93(6):898-905.
5. Peh GSL, Beuerman RW, Colman A, Tan DT, Mehta JS. Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation: an overview. *Transplantation*. 2011;91(8):811-819.
6. Li W, Sabater AL, Chen Y-T, et al. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(2):614-620.
7. Joyce N. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2003;22(3):359-389.
8. Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, et al. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS One*. 2012;7(1):e29677.
9. He Z, Campolmi N, Gain P, et al. Revisited microanatomy of the corneal endothelial periphery: new evidence for continuous centripetal migration of endothelial cells in humans. *Stem Cells*. 2012;30(11):2523-2534.
10. Tuft SJ, Coster DJ. The Corneal Endothelium. *Eye*. 1990:389-424.
11. Fischbarg J. Mechanism of fluid transport across corneal endothelium and other epithelial layers: a possible explanation based on cyclic cell volume regulatory changes. *British Journal of Ophthalmology*. 1997;81(1):85-89.
12. Barry P a, Petroll WM, Andrews PM, Cavanagh HD, Jester J V. The spatial organization of corneal endothelial cytoskeletal proteins and their relationship to the apical junctional complex. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1995;36(6):1115-1124.

13. Zhu C. Proliferative Response of Corneal Endothelial Cells from Young and Older Donors *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004;45(6):1743-1751
14. Ishino Y. Amniotic Membrane as a Carrier for Cultivated Human Corneal Endothelial Cell Transplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004;45(3):800-806.
15. Yamaguchi M, Ebihara N, Shima N, et al. Adhesion, migration, and proliferation of cultured human corneal endothelial cells by laminin-5. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52(2):679-684.
16. Blake D a, Yu H, Young DL, Caldwell DR. Matrix stimulates the proliferation of human corneal endothelial cells in culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1997;38(6):1119-1129.
17. Joyce NC, Harris DL, Zieske JD. Mitotic Inhibition of Cornea! Endothelium in Neonatal Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1998:2572-2583.
18. Leonard A. Levin, Siv F. E. Nilsson. James Ver Hoeve SMW. *Physiology of the Eye Adler ' S.*; 2011.
19. Bi Y-L, Zhou Q, Du F, Wu M-F, Xu G-T, Sui G-Q. Regulation of functional corneal endothelial cells isolated from sphere colonies by Rho-associated protein kinase inhibitor. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2013;5(2):433-437.
20. Joyce NC, Meklir B, Joyce SJ, Zieske JD. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1996;37(4):645-655.
21. Liu Z, Zhuang J, Li C, et al. Long-term cultivation of human corneal endothelial cells by telomerase expression. *Experimental Eye Research*. 2012;100:40-51.
22. Senoo T, Obara Y, Joyce NC. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2000;41(10):2930-2935.
23. Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: a morphologic study. *Cornea*. 2001;20(7):731-737.
24. Fan T, Zhao J, Ma X, Xu X, Zhao W, Xu B. Establishment of a continuous untransfected human corneal endothelial cell line and its biocompatibility to denuded amniotic membrane. *Molecular Vision*. 2011;17:469-480
25. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye (Lond)*. 2003;17:912-918. doi:10.1038/sj.eye.6700559.

26. Bednarz J, Teifel M, Friedl P, Engelmann K. Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 2000;78:130-136.
27. Aldave a J, Han J, Frausto RF. Genetics of the corneal endothelial dystrophies: an evidence-based review. *Clinical Genetics*. 2013;84(2):109-119.
28. Schmedt T, Silva MM, Ziaei A, Jurkunas U. Molecular bases of corneal endothelial dystrophies. *Experimental Eye Research*. 2012;95(1):24-34.
29. Uchino Y, Goto E, Takano Y, et al. Long-standing Bullous Keratopathy Is Associated with Peripheral Conjunctivalization and Limbal Deficiency. *Ophthalmology*. 2006;113:1098-1101.
30. Zaniolo K, Bostan C, Rochette Drouin O, et al. Culture of human corneal endothelial cells isolated from corneas with Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Experimental Eye Research*. 2012;94(1):22-31.
31. Waring GO, Rodrigues MM, Laibson PR. Corneal dystrophies. II. Endothelial dystrophies. *Survey of Ophthalmology*. 1978;23(3):147-168.
32. Brady SE, Rapuano CJ, Arentsen JJ, Cohen EJ, Laibson PR. Clinical indications for and procedures associated with penetrating keratoplasty, 1983-1988. *American Journal of Ophthalmology*. 1989;108(2):118-122.
33. Kannabiran C. Genetics of corneal endothelial dystrophies. *Journal of Genetics*. 2009;88(4):487-494.
34. Aldave AJ, Yellore VS, Yu F, et al. Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy Is Associated With TCF8 Gene Mutations and Abdominal Hernia. *American Journal of Medical Genetics*. 2007;2556:2549-2556.
35. Krueger RR, Ramos-Esteban JC, Kanellopoulos a J. Staged intrastromal delivery of riboflavin with UVA cross-linking in advanced bullous keratopathy: laboratory investigation and first clinical case. *Journal of Refractive Surgery*. 2008;24:S730-S736.
36. Zhu S, Ne B, Kiel D-. Adhesion molecule expression in bullous keratopathy. *Cornea*. 1996;1:159-166.
37. Schanzlin DJ, Robin JB, Gomez DS, Gindi JJ, Smith RE. Results of penetrating keratoplasty for aphakic and pseudophakic bullous keratopathy. *American Journal of Ophthalmology*. 1984;98:302-312.

38. Sugar a, Meyer RF, Heidemann D, et al. Specular microscopic follow-up of corneal grafts for pseudophakic bullous keratopathy. *Ophthalmology*. 1985;92(3):325-330.
39. Fuchsluger T a, Jurkunas U, Kazlauskas a, Dana R. Anti-apoptotic gene therapy prolongs survival of corneal endothelial cells during storage. *Gene Therapy*. 2011;18(8):778-787.
40. Robaei D, Watson S. Corneal blindness: a global problem. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2014;42(3):213-214.
41. Teichmann J, Valtink M, Gramm S, et al. Human corneal endothelial cell sheets for transplantation: thermo-responsive cell culture carriers to meet cell-specific requirements. *Acta Biomaterialia*. 2013;9(2):5031-5039.
42. Pires RT, Tseng SC, Prabhasawat P, et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Archives of Ophthalmology*. 1999;117:1291-1297.
43. Whikehart DR, Parikh CH, Vaughn A V, Mishler K, Edelhauser HF. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Molecular Vision*. 2005; 816-824.
44. Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: Contact inhibition and TGF- β 2. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2002;43:2152-2159.
45. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 Function and Dysfunction. *Cell*. 1992;70:523-526.
46. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, et al. Enhancement of corneal endothelium wound healing by Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor eye drops. *British Journal of Ophthalmol*. 2011;95(7):1006-1009.
47. Engelmann K, Friedl P. Optimization of culture. *In vitro cellular & Developmental Biology*. 1989;25(l).
48. Proulx S, Brunette I. Methods being developed for preparation, delivery and transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium. *Experimental Eye Research*. 2012;95(1):68-75.
49. Brandl C, Florian C, Driemel O, Weber BHF, Morsczeck C. Identification of neural crest-derived stem cell-like cells from the corneal limbus of juvenile mice. *Experimental Eye Research*. 2009;89(2):209-217.
50. Bednarz J, Doubilei V, Wollnik PC, Engelmann K. Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells. *British Journal of Ophthalmology*. 2001;85(12):1416-1420.

51. Mimura T, Amano S, Usui T, et al. Transplantation of corneas reconstructed with cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. *Experimental Eye Research*. 2004;79(2):231-237.
52. Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005;46(5):1626-1631.
53. Freshney RI. *Culture of Animal Cells*.; 1984:273-280.
54. Joyce NC, Harris DL. Decreasing expression of the G1-phase inhibitors, p21Cip1 and p16INK4a, promotes division of corneal endothelial cells from older donors. *Molecular Vision*. 2010; 897-906.
55. Engelmann K, Böhnke M, Friedl P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1988;29(11):1656-1662.
56. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Amano S. Selective isolation of young cells from human corneal endothelium by the sphere-forming assay. *Tissue Engineering*. 2010;16(4):803-812.
57. Bongso A, Eng HL. *STEM CELLS From Bench to Bedside*.; 2005.
58. Lanza R, Gearhart J, Hogan B, Melton D. *Essentials of Stem Cell Biology*.; 2005.
59. Renwick Monroe Kristen, B. Miller Ronald STJ. *Fundamentals of the Stem Cell Debate: The Scientific, Religious, Ethical & Political Issues*.2008.
60. Gil J, Stembalska A, Pesz K a, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *Journal of Applied Genetics*. 2008;49(2):193-199.
61. Yu WY, Sheridan C, Grierson I, et al. Progenitors for the corneal endothelium and trabecular meshwork: a potential source for personalized stem cell therapy in corneal endothelial diseases and glaucoma. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;2011:412743.
62. Turksen K. *Stem cell Biology and Regenerative Medicine*. 2009:29.11.5.
63. McGowan SL, Edelhauser HF, Pfister RR, Whikehart DR. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. *Molecular Vision*. 2007;1984-2000.
64. Joyce NC, Harris DL, Markov V, Zhang Z, Saitta B. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium. *Molecular Vision*. 2012; 547-564.

65. He Z, Campolmi N, Ha Thi B-M, et al. Optimization of immunolocalization of cell cycle proteins in human corneal endothelial cells. *Molecular Vision*. 2011; 3494-3511.
66. Peh GSL, Toh K-P, Wu F-Y, Tan DT, Mehta JS. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *PLoS One*. 2011;6(12):e28310.
67. O'Neal MR, Polse K a. Decreased endothelial pump function with aging. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1986;27(4):457-463.
68. Fan T, Ma X, Zhao J, et al. Transplantation of tissue-engineered human corneal endothelium in cat models. *Molecular Vision*. 2013; 400-407.
69. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007;48(10):4519-4526.
70. Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Molecular Biotechnology*. 2002;22(604):51-86.
71. Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J, Kuklinska E. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *Journal of Investigative Dermatology*. 1989;93:287-290.
72. Krieger M, Kay LM, Stroud RM. Structure and specific binding of trypsin: comparison of inhibited derivatives and a model for substrate binding. *Journal of Molecular Biology*. 1974;83(2):209-230.
73. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem / Progenitor Cell Properties. *Cancer Research*. 2005;(13):5506-5512.
74. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Sphere therapy for corneal endothelium deficiency in a rabbit model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005;46(9):3128-3135.
75. Cheong YK, Ngoh ZX, Peh GSL et al. Identification of cell surface markers glypican-4 and CD200 that differentiate human corneal endothelium from stromal fibroblasts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54(7):4538-4547.
76. Bednarz J, Rodokanaki-von Schrenck a, Engelmann K. Different characteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*. 1998; 149-153.

77. Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX Alternativen zu Tierexperimenten*. 2003;20:275-281.
78. Kan M, Yamane I. In vitro proliferation and lifespan of human diploid fibroblasts in serum-free BSA-containing medium. *Journal of Cell Physiology*. 1982;111:155-162.
79. Wright B, Connon CJ. *Corneal Regenerative Medicine*. Humana Press; 2013.
80. MacCallum DK, Lillie JH, Scaletta LJ, Occhino JC, Frederick WG, Ledbetter SR. Bovine corneal endothelium in vitro. *Experimental Cell Research*. 1982;139(1):1-13.
81. Gruschwitz R, Friedrichs J, Valtink M, et al. Alignment and cell-matrix interactions of human corneal endothelial cells on nanostructured collagen type I matrices. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010;51(12):6303-6310.
82. Yavin E, Yavin Z. Attachment and Culture of Dissociated Cells From Rat Embryo Cerebral Hemispheres on Poly Lysine-Coated Surface. *Journal of Cell Biology*. 1974;62:540-546.
83. Fitch KL, Nadakavukaren MJ, Richardson a. Age-related changes in the corneal endothelium of the rat. *Experimental Gerontology*. 1982;17:179-183.

